

UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE
Ecole doctorale « Des génomes aux organismes »



THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE

Spécialité

Biologie Cellulaire et Moléculaire

Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de la dystrophie myotonique de type 1 à l'aide de cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale

Antoine Marteyn

Soutenue le 7 Septembre 2010 à Evry devant le jury composé de :

Dr. Javier Perea, Président

Dr. Alain Chedotal, Rapporteur

Dr. Denis Furling, Rapporteur

Dr. Anne-Lise Bennaceur-Griscelli, Examineur

Dr. Cécile Martinat, Co-Directeur de thèse

Dr. Marc Peschanski, Co-Directeur de thèse



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury : au Dr. Javier Perea pour avoir consenti à le présider, aux Dr. Alain Chedotal et Denis Furling qui ont accepté d'en être les rapporteurs, et au Dr. Anne-Lise Bennaceur-Griscelli qui s'est jointe à eux pour évaluer les travaux réalisés au cours de ce doctorat.

Je tiens également à remercier le conseil régional d'Ile-de-France qui m'a fait bénéficier d'une allocation de recherche doctorale de trois ans sans laquelle je n'aurais pu réaliser l'ensemble de mes travaux de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Marc Peschanski d'avoir accepté de m'accueillir au sein du laboratoire I-Stem, et de m'avoir ainsi permis de développer de multiples compétences dans le domaine des cellules souches embryonnaires humaines.

Je remercie également les Dr. Geneviève Piétu et Cécile Martinat pour m'avoir accordé leur confiance en m'intégrant à leur groupe de recherche. Mes remerciements vont plus particulièrement à Cécile pour m'avoir encadré au cours de ces années où nous avons travaillé ensemble et durant lesquelles tu as participé à mon épanouissement scientifique en me permettant de présenter mes travaux dans des congrès internationaux. Merci également pour ton optimisme qui m'a parfois permis d'écourter certains passages à vide liés à ce que tu appelais ma « résultats dépendance », lorsque nous avons composé pendant plusieurs mois la petite équipe « maladies du motoneurone » qui s'est d'ailleurs bien développée depuis ...

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui ont composé à un moment ou à un autre cette équipe ainsi que toutes celles qui ont travaillé sur la DM1 et qui ont joué un rôle important dans l'avancée du projet. Un grand merci à Camille Lecuyer pour toutes ces heures passées en compagnie de nos amies microscopiques. Sans ton aide, nous n'aurions pas eu l'occasion de faire autant d'expériences. Merci également à Rémi Vernet pour ses travaux sur la jonction neuromusculaire, ainsi qu'à Morgane Gauthier pour sa forte implication dans les recherches concernant ZNF37A et pour son précieux soutien dans les moments critiques.

Merci à Geneviève Piétu, Christine Baldeschi, Delphine Laustriat, Aurore Bugi, Morgane Gauthier et Christelle Rochon pour leurs suggestions et les corrections apportées à ce manuscrit.

Une page ne pouvant être suffisante pour remercier l'ensemble des stagiaires, thésards, techniciens, ingénieurs, docteurs ou plus encore, que j'ai côtoyé de plus ou moins près au laboratoire, je remercie tous les istémiens qui m'ont aidé dans mon projet ou avec qui j'ai simplement partagé de bons moments. Toutefois, je tiens à remercier plus particulièrement Christelle Rochon, pour m'avoir aussi bien intégré au laboratoire au début de ma thèse que récemment dans la suite de mon parcours. Je

remercie également Bénita, Sophie, Rinka, Paupau, DJ, Mika, Momo « Heu » et Ploum, avec qui la culture cellulaire devient un réel plaisir. Merci aussi à Aurore Bugi, Laetitia Aubry, Delphine Laustriat, Jessica Feitera, Maxime Feyeux, Jérémie Charbord, Sacha Reichman et aux autres membres du bureau 407 qui y font régner une atmosphère amicale et chaleureuse avec l'aide de Jackie Gide, Laetitia Barrault et Yves Maury.

Je tiens également à remercier la famille Maizener ainsi qu'Alain Chapel qui ont réussi à me convaincre de réaliser cette thèse. Je leur en suis très reconnaissant, ces dernières années auront été extrêmement enrichissantes et bénéfiques.

Enfin, je voudrais remercier mes amis, ceux du baron, ceux de la Giet', Aurélien et les autres qui ont su à leur manière me faire décompresser et me soutenir tout au long de ce doctorat.

Pour conclure, j'adresse mes remerciements à mon entourage le plus proche, « el tucan » et Cyril qui ont toujours été présents lorsque j'en ai eu besoin ainsi que Céline et Vincent, Marie et mes parents.

Sommaire

Sommaire	2
Liste des abréviations	7
Résumé	10
Avant-propos	11
Introduction	13
1. La Dystrophie Myotonique de type 1	14
1.1. Les symptômes	14
1.2. Caractéristiques génétiques	17
1.2.1. Généralités	17
1.2.2. Instabilité et anticipation génétique	17
1.3. Mécanismes physiopathologiques	18
1.3.1. Haploinsuffisance en <i>DMPK</i>	19
1.3.2. Haploinsuffisance des gènes adjacents <i>SIX5</i> et <i>DMWD</i>	20
1.3.3. Gain de fonction de l'ARNm toxique	21
1.4. Altération de la maturation des ARNm	24
1.4.1. Altération des protéines de fixation aux ARNs	24
1.4.1.1. CUGBP1	24
1.4.1.2. MBNL1	27
1.4.2. Défaut de l'épissage alternatif	29

1.4.2.1.	L'épissage alternatif.....	29
1.4.2.2.	L'épissage alternatif dans la DM1	32
1.4.2.2.1.	Myotonie et défaut d'épissage alternatif du canal chlore ClC-1.....	35
1.4.2.2.2.	Résistance à l'insuline et défaut d'épissage alternatif du récepteur à l'insuline.....	37
1.4.2.2.3.	Atteinte du système nerveux central et défauts d'épissage alternatif liés à la DM1	39
1.4.3.	Effet trans-dominant des CTG sur l'expression des gènes.....	39
1.5.	Approches thérapeutiques.....	41
1.5.1.	Cibler les ARNm DMPK mutés	42
1.5.1.1.	Approche d'extinction de l'ARNm <i>DMPK</i> muté	42
1.5.1.2.	Inhiber la fixation des protéines de liaison à l'ARN muté	43
1.5.1.3.	Favoriser l'export cytoplasmique des ARNm mutés	44
1.5.2.	Approche de compensation de l'expression de MBNL1 et CUGBP1	45
1.5.2.1.	Surexpression de MBNL1	45
1.5.2.2.	Réduction de l'activité de CUGBP1	45
1.5.3.	Approches symptomatologiques.....	46
2.	Modélisation pathologique de la DM1	48
2.1.	Choix de l'approche	49
2.1.1.	Approche basée sur un mécanisme d'action	50
2.1.2.	Approche fonctionnelle.....	50
2.1.3.	Approche physiologique	50
2.2.	Modèles pathologiques de la DM1	51
2.2.1.	Modèles animaux de la DM1	51
2.2.2.	Modèles cellulaires	56

2.2.2.1.	« Dissection » des anomalies moléculaires associées à la DM1	56
2.2.2.2.	« Dissection » de certains défauts fonctionnels associés à la DM1	56
2.2.2.2.1.	Anomalies musculaires	56
2.2.2.2.2.	Anomalies du système nerveux	57
2.3.	Avantages et limitations des modèles existants	58
2.3.1.	Avantages et limites des modèles animaux	58
2.3.2.	Avantages et limites des systèmes cellulaires	58
3.	Modélisation pathologique à l'aide de cellules souches pluripotentes humaines	61
3.1.	Les cellules souches pluripotentes	61
3.1.1.	Les cellules souches embryonnaires humaines	61
3.1.1.1.	Origine et dérivation	61
3.1.1.2.	Bioéthique et recherche sur les CSEh	62
3.1.1.3.	Caractérisation et propriétés des CSEh	63
3.1.1.4.	Culture des CSEh.....	65
3.1.2.	Les cellules souches pluripotentes induites.....	66
3.2.	Développement de la moelle épinière et des motoneurones	69
3.2.1.	Première étape du développement du SNC.....	69
3.2.2.	Spécification neuronale de la moelle épinière.....	71
3.2.2.1.	Caudalisation du SNC et acquisition du profil spinal	72
3.2.2.2.	Mécanisme de ventralisation du SNC	74
3.2.2.3.	Développement des motoneurones	75
3.3.	La jonction neuromusculaire.....	76
3.3.1.	Composition	76

3.3.2.	Etablissement de la jonction neuromusculaire	78
3.3.2.1.	Guidance axonale.....	78
3.3.2.2.	Accumulation des récepteurs à l'ACh à la membrane post-synaptique	79
3.3.2.3.	Différenciation des CSEh en motoneurones	80
3.3.2.3.1.	Induction neurale des CSEh	80
3.3.2.3.2.	Détermination neurale et différenciation en motoneurones.....	81
Problématique.....		Erreur ! Signet non défini.
Résultats.....		Erreur ! Signet non défini.
1.	Identification de mécanismes moléculaires pouvant altérer le développement de la jonction neuromusculaire	Erreur ! Signet non défini.
1.1.	Identification de modulations géniques	Erreur ! Signet non défini.
1.2.	Analyse fonctionnelle de la neuritogenèse dans des neurones issus de CSEh DM1 ...	Erreur ! Signet non défini.
1.3.	Effet de la sous-expression de SLITRK2 et SLITRK4 dans l'arborisation aberrante du réseau neuritique	Erreur ! Signet non défini.
1.4.	Mise en évidence d'un nouveau défaut d'épissage alternatif dans la DM1 sur le récepteur à l'éphrine A5 (EPHA5)	Erreur ! Signet non défini.
2.	Association et implication de l'altération du facteur de transcription ZNF37A dans la DM1	Erreur ! Signet non défini.
2.1.	Défaut d'expression d'un nouveau facteur de transcription associé à la DM1	Erreur ! Signet non défini.
2.2.	Mécanismes moléculaires de la régulation de l'expression du facteur de transcription ZNF37A par la mutation DM1	Erreur ! Signet non défini.
2.3.	ZNF37A et répression transcriptionnelle du récepteur à l'interleukine 13	Erreur ! Signet non défini.
Discussion et perspectives		Erreur ! Signet non défini.

1. Quelles sont les conséquences neurophysiopathologiques de la DM1 ?**Erreur ! Signet non défini.**
 2. La DM1 : maladie des épissages alternatifs altérés ou maladie à plus large spectre ?.....**Erreur ! Signet non défini.**
 3. Quelle est la meilleure approche permettant d'étudier les mécanismes physiopathologiques d'une maladie?**Erreur ! Signet non défini.**
 4. Les CSEh : nouvel outil cellulaire pour la modélisation pathologique ?**Erreur ! Signet non défini.**
- Références bibliographiques**Erreur ! Signet non défini.**

Liste des abréviations

(rh)IGF-1 : (human recombinant) insulin growth factor 1

AAV : adeno-associated virus

AChR : récepteurs à l'acétylcholine

ADN : acide désoxyribonucléique

ALS : Amyotrophic lateral sclerosis

AON : oligonucléotides antisens

APP : précurseur de l'amyloïde

ARN : acide ribonucléique

ARNi : ARN interférent

AVC : accident vasculaire cérébral

BDNF (brain-derived neurotrophic factor

BMP : Bone Morphogenic Protein

CELF : CUG-binding protein and embryonic lethal abnormal vision-type RNA-binding protein 3-like factors

ChAT : choline acétyltransférase

ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation

ClC-1 : canal chlore musculaire

CSE(h) : cellule souche embryonnaire (humaine)

cTNT : troponine cardiaque

CUGBP1 : CUG-binding protein

DHEA : déhydroépiandrosterone

DM1/2 : dystrophie myotonique de type 1/2

DMPK : myotonic dystrophy protein kinase

DMWD : Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif

DPI : diagnostic préimplantatoire

DRPLA : Dentatorubral Pallidoluysian atrophy

EB : embryoid body, corps embryotaire

EPHA5 : récepteur A5 à l'éphrine

FGF : fibroblast growth factors

FISH : fluorescence *in situ* hybridization

FXTAS : Fragile X-associated tremor ataxia syndrome

GDNF : Glial cell line-derived neurotrophic factor
 GFAP : Glial fibrillary acidic protein
 GFP : Green Fluorescent Protein
 GMP : Good Manufacturing Practice
 GRE : Élément riche en GU
 HD : Huntington's disease
 HDL2 : Huntington's diseaselike 2
HGMD : human gene mutation database
 hnRNP : heterogenous nuclear ribonucleoprotein
 HSA^{LR} : human skeletal actine long repeat
 IL13RA1 : sous unité •1 du récepteur à la l'interleukine 13
 IL4 : interleukine 4
 iPSCs : Induced Pluripotent Stem Cells, cellules souches pluripotentes induites
 IR : récepteur à l'insuline
 JNM : jonction neuromusculaire
 Kap1 : KRAB-associated protein 1
 Klf4 : Kruppel-like factor 4
 KO : Knock Out
 KRAB : Krüppel-associated box
 KSR : Knock-out Serum Replacement
 LIF : Leukemia Inhibitory Factor
 LMC(m/l) : colonne motrice latérale (médiane/latérale)
 LRR : Leucine-Rich Repeat
 MAP2 : Microtubule Associated Protein 2
 MAPT : Tau
 MBNL : muscleblind
 MCK : créatine kinase musculaire
 MEF : murine embryonic fibroblasts, fibroblastes embryonnaires murins
 MEF2A : myocyte enhancer factor 2A
 MMC(m) : colonne motrice médiane (division médiane)
 MTMR1 : homologue à la myotubularine
 MuSK : muscle skeletal receptor tyrosine kinase
 MYPT1 : Myosin Phosphatase-1
 NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
 NMDAR1 : récepteur 1 de la N-méthyl-D-aspartate
 NOS :oxyde nitrique synthétase, NO synthase

NSC : Neural Stem Cell
 NT3 : neurotrophin-3
 Pax6 : Paired box gene 6
 PDGF-A : Platelet-Derived Growth Factor-A
 PKC : protéine kinase C
 PLM : Phospholemman
 PLN : Phospholamban
 POI : Premature Ovarian Insufficiency
 PROMM : myopathie myotonique proximale
 rhIGFBP3 : recombinant human IGF binding protein 3
 RISC : RNA-Induced Silencing Complex
 RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
 RyR : récepteur de la ryanodine
 SBMA : Spinal and Bulbar Muscular Atrophy
 SCAs : Spinocerebellar Ataxias
 SERCA1/2 : Ca²⁺-ATPases 1/2 du réticulum sarco/endoplasmique
 Shh : sonic Hedgehog
 shRNA : small hairpin RNA
 siRNA : short interfering RNA
 SIX 5 : Sine oculis homeobox homolog 5
 SNC : système nerveux central
 SNP : système nerveux périphérique
 Sox1 : sex determining region-Y-box1
 Sox2 : SRY box-containing gene 2
 SP1 : Specificity protein 1
 SSEA-3/4 : stage specific embryonic antigen 3/4
 TERT : telomerase reverse transcriptase
 TGF• : Tumor Growth Factor •
 TNF : Tumor Necrosis Factor
 TNNT2 : troponine cardiaque de type 2
 TNNT3 : troponine squelettique de type 3
 TRA-1-60/-1-81/-2-49/-2-54 : tumeur rejection antigen -1-60/-1-81/-2-49/-2-54
 UTR : untranslated region
 VAcHT : transporteurs vésiculaires à l'acétylcholine
 ZNF37A : Zinc finger protein A37

Résumé

Parmi leurs applications prometteuses, les cellules souches pluripotentes humaines présentent un potentiel inestimable pour améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de maladies monogéniques. Cette application est dans un premier temps devenue possible grâce à l'utilisation de lignées de cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) porteuses de mutation causale de maladie monogénique, obtenues au cours d'un diagnostic pré-implantatoire, puis dans un second temps par la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes (iPS).

Dans le cadre de la validation de ce concept, nous avons démontré que des lignées de CSEh porteuses de la mutation causale de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1), ainsi que leurs progénies neurales et mésodermiques, exprimaient des défauts moléculaires caractéristiques de la pathologie. Par l'intermédiaire d'une étude transcriptomique comparative, nous avons identifié une liste de biomarqueurs pouvant être considérés comme une nouvelle signature moléculaire de la DM1. Parmi ces derniers, nous avons montré que l'anomalie d'expression de certains gènes de la famille SLITRK était à l'origine des défauts d'arborisation neuritique mis en évidence dans des cellules motoneuronales dérivées des CSEh mutées, et que ces cellules peuvent interagir avec leur cible musculaire. Parallèlement, nous avons identifié un facteur de transcription à domaine Krab dont l'expression est fortement altérée dans la DM1 et qui semble être impliqué dans les défauts de régénération musculaire associé à la DM1.

En conclusion, l'ensemble de ce travail vise à étendre la sphère d'utilisation des CSE humaines à des fins thérapeutiques en définissant leur capacité à modéliser une maladie génétique de façon suffisamment précise pour permettre d'élaborer des biothérapies spécifiquement liées aux mécanismes moléculaires mis en jeu.

Mots clés : cellules souches embryonnaires humaines, dystrophie myotonique de type 1, différenciation, motoneurone, jonction neuro-musculaire, SLITRK, ZNF27A, EphA5.

Avant-propos

Les cellules souches pluripotentes humaines, telles que les cellules souches embryonnaires humaines, représentent aujourd'hui un enjeu thérapeutique majeur tant par leur potentiel de prolifération illimité que par leur capacité à se différencier dans tous les types cellulaires de l'organisme. L'application thérapeutique des cellules souches la plus répandue est celle de la thérapie cellulaire pour laquelle il est possible d'envisager d'injecter ces cellules au sein d'organes lésés afin de les « réparer ». Cependant l'exploitation du potentiel thérapeutique des cellules souches n'en est qu'à ses prémices car les mécanismes gouvernant leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation sont encore mal connus et que de nombreux points restent encore à être résolus avant d'arriver à de telles approches.

Outre leur application en thérapie cellulaire, les cellules souches pluripotentes peuvent également s'avérer être un outil majeur pour la compréhension des mécanismes de certaines pathologies puisqu'il est possible d'obtenir des lignées de cellules souches embryonnaires humaines portant la mutation causale d'une maladie monogénique, ou de créer des cellules pluripotentes par reprogrammation de cellules somatiques issus de patients. Les conséquences de la mutation peuvent alors être étudiées au cours de la différenciation de ces cellules vers les tissus atteints. Grâce à tous ces avantages, ces lignées de cellules souches pluripotentes semblent donc constituer un modèle de choix dans le domaine de la modélisation pathologique.

Les cellules souches pluripotentes offrent donc des axes de recherche prometteurs et c'est dans ce contexte que j'ai effectué ma thèse au sein de l'institut I-STEM (Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des maladies Monogéniques). L'objectif général d'I-STEM, crée en 2005, est d'explorer le potentiel thérapeutique des cellules souches pluripotentes humaines dans le cadre de maladies monogéniques. Dans ce contexte, l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse cherche à utiliser des lignées de cellules souches pluripotentes pour mieux comprendre certains mécanismes impliqués dans le développement de maladies neuro-musculaires. Ces lignées ont également servi aux développements de criblages de molécules potentiellement thérapeutiques, capables d'interférer avec des phénomènes moléculaires et cellulaires induits par la présence de la mutation, soit pour rechercher des mécanismes d'action soit pour en déterminer la toxicité.

Pour démontrer la faisabilité de cette approche novatrice, nous avons utilisé deux lignées de cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale de la dystrophie myotonique de type 1. Validant la pertinence de ces cellules, l'équipe du Dr. Piétu au laboratoire a mis en évidence la présence de sigmas moléculaires caractéristiques de la DM1 au niveau des progénies

neurales et mésodermiques, types cellulaires normalement affectés dans cette pathologie. Parallèlement, l'équipe du Dr. Piétu a effectué une étude transcriptomique sur ces populations cellulaires afin d'identifier des gènes spécifiquement modulés par la présence de la mutation.

En se basant sur cette liste, l'objectif général de ma thèse a été d'étudier et de valider les conséquences physiopathologiques de ces modulations.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à la diminution d'expression d'un gène codant pour un répresseur de la transcription à domaine Krab. Ce gène nous apparaissait intéressant dans la mesure où son expression est fortement diminuée dans les cellules mutées, à tous les états de différenciation étudiés. Cette étude nous a permis d'élargir les mécanismes d'action de la mutation DM1 et d'identifier un nouveau mécanisme physiopathologique pouvant participer aux défauts myogéniques observés chez les patients DM1 (Article 1, en préparation).

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à la modulation d'expression de deux gènes, SLITRK4 et SLITRK2, dans les progénies neurales issues des CSEh DM1. D'un point de vue physiopathologique, ces gènes sont intéressants dans la mesure où ils ont été impliqués dans des phénomènes de neuritogénèse. Cette étude nous a permis de relier ces défauts d'expression géniques à un phénotype d'arborisation neuritique anormal observé dans des cultures cholinergiques issues des CSEh DM1. De façon intéressante, ce défaut de neuritogénèse peut être mis en relation avec des anomalies de synaptogénèse (Article 2, en préparation).

En cherchant à étudier les mécanismes moléculaires de ces anomalies géniques, nous avons mis en évidence un nouveau défaut d'épissage alternatif affectant l'expression du gène codant pour le récepteur aux Ephrines A5.

En conclusion, mes travaux ont contribué à valider la preuve de concept quant à l'utilisation des CSEh pour réaliser de la modélisation pathologique. En effet, à travers l'utilisation de lignées de CSEh porteuses de la mutation causale de la DM1, l'ensemble des recherches de mon projet de thèse a consisté à valider l'implication de ces différents gènes dans des processus physiopathologiques de la DM1 avant d'en étudier leurs mécanismes cellulaires et moléculaires.

Introduction

1. La Dystrophie Myotonique de type 1

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) appartient au groupe des dystrophies musculaires et a été décrite pour la première fois en 1904 par le médecin allemand Hans Steinert, d'où sa deuxième appellation de « maladie de Steinert ». Jusqu'à l'identification du gène porteur de l'anomalie génétique près de 90 ans plus tard, les multiples symptômes de la DM1 (Harper, 2001) et son mode de transmission ont été décrit en détail par des études épidémiologiques. Cette maladie neuromusculaire se caractérise principalement par une myotonie, c'est-à-dire par une lenteur et une difficulté à la décontraction musculaire après stimulation, ainsi que par un affaiblissement musculaire progressif résultant d'une atrophie musculaire. La DM1 se distingue des autres dystrophies musculaires dans le sens où ce sont les muscles distaux (muscles des extrémités) qui sont affectés et non les proximaux (muscles de la ceinture pelvienne et scapulaire) comme dans la majorité des cas. La DM1 est la plus fréquente des maladies neuromusculaires avec une prévalence de 1 pour 8000. Même si elle est présente partout dans le monde, elle reste rare en Afrique alors qu'elle touche 1 personne sur 500 près du lac Saint-Jean au Québec (Yotova *et al.*, 2005). En plus de la forme tardive asymptomatique, il existe trois formes de dystrophie myotonique : la congénitale, l'infantile et la plus habituelle, celle de l'adulte jeune : la juvénile. Bien que les symptômes de la DM1 peuvent apparaître à tout moment de la vie de l'individu, ils sont en général diagnostiqués entre 10 et 30 ans et leur importance est très variable d'une personne à l'autre, y compris parmi les membres d'une même famille. Actuellement, il n'existe aucun traitement autre que symptomatique et les personnes atteintes de la DM1 sont principalement prises en charge afin de prévenir les complications, notamment cardiaques et respiratoires, et d'améliorer leur confort de vie.

1.1. Les symptômes

Bien que l'atteinte musculaire soit souvent au premier plan en raison des deux signes cliniques majeurs que sont la dystrophie et la myotonie, cette maladie est multisystémique dans la mesure où de nombreux autres organes sont affectés. En effet, aux côtés des altérations fonctionnelles des muscles squelettiques et lisses, plusieurs études ont décrit des atteintes au niveau de l'œil avec l'apparition de cataractes (Abe *et al.*, 1999), des troubles du rythme et de la conduction cardiaque, une atteinte des appareils respiratoire et digestif, un dysfonctionnement du système endocrinien (Lou *et al.*, 1994), des anomalies au niveau du système nerveux central (SNC) avec une atteinte cognitive (Harper, 2001) et des problèmes psychologiques (Delaporte, 1998; Meola *et al.*, 2003), ou encore des troubles du sommeil (Damian *et al.*, 2001; Park et Radtke, 1995) ainsi que l'apparition d'une calvitie (Bouhour *et al.*, 2007). Toutefois, ces symptômes ne sont pas forcément tous présents chez une même personne et leur manifestation est plus ou moins importante et précoce selon la forme de la maladie (Tableau 1).

Système / Organe	Atteinte
Endocrinien	<ul style="list-style-type: none"> • Résistance à l'insuline • Atrophie testiculaire • Taux élevés de FSH
Yeux	<ul style="list-style-type: none"> • Cataracte • Ptose • Dégénérescence de la rétine
Cœur	<ul style="list-style-type: none"> • Défaut de conduction • Arythmie cardiaque
Respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> • Faiblesse et myotonie du diaphragme et des muscles respiratoires • Anomalies de contraction du pharynx et de l'œsophage. • Hypoventilation alvéolaire • Aspiration branchiale
Cerveau	<ul style="list-style-type: none"> • Retard mental dans les formes congénitales • Hypersomnie • Un déclin cognitif variable • Troubles de la personnalité: apathie élevée, évitement et comportement d'agressivité passive
Peau	<ul style="list-style-type: none"> • Calvitie prématurée
Muscle Lisse	<ul style="list-style-type: none"> • Constipation et diarrhées • Douleurs abdominales de type coliques • Syndrome pseudo-occlusif • Contractions non-ordonnées de l'utérus durant l'accouchement
Muscle squelettique	<ul style="list-style-type: none"> • Myotonie • Faiblesse et perte musculaires • Faiblesse des muscles distaux et tardivement des muscles proximaux • Faiblesse des muscles de la face, de la mâchoire, de la langue et des muscles fléchisseurs du cou • Atrophie du sternocléidomastoïdien

Tableau 1 : Symptômes cliniques de la DM1 chez l'adulte (d'après Harper, 1989 et Delaporte, 1998).

Selon les symptômes et l'âge de déclaration de la maladie, la DM1 peut être schématiquement divisée en quatre catégories cliniques (Bouhour *et al.*, 2007) :

• **La forme congénitale** qui est la forme la plus sévère avec des symptômes présents dès la naissance. Cette forme, presque exclusivement à transmission maternelle, se manifeste dès la période intra-utérine par une quantité trop importante de liquide amniotique (hydramnios) et par une diminution des mouvements fœtaux. A la naissance, le bébé est hypotonique et possède une détresse respiratoire. S'il survit, l'enfant présente généralement une déficience intellectuelle, un retard dans le développement moteur et musculaire ainsi que des difficultés à avaler et donc à se nourrir (Figure 1).

• **La forme juvénile (infantile)**, mal définie, débute avant l'âge de 10 ans. Dans ce cas, la transmission maternelle n'est pas une règle. Les enfants atteints présentent des faiblesses des muscles faciaux, un retard mental accompagné de troubles psychologiques.

• **La forme adulte** qui est la forme la plus répandue avec une apparition des symptômes entre l'âge de 20 et 40 ans. L'atteinte concerne les muscles squelettiques, les muscles lisses, les systèmes cardio-respiratoire, endocrinien, oculaire et nerveux.

• **La forme tardive asymptomatique** qui est détectée chez les personnes âgées et dont les symptômes se limitent à une faiblesse musculaire minimale ou absente, une cataracte, et pour les hommes à une calvitie précoce. Toutefois, aucune myotonie n'est observée.



Figure 1 : Morphologie faciale caractéristique de la DM1. Sur l'image de gauche, l'enfant atteint de la forme congénitale de la DM1 présente une anomalie au niveau de la lèvre supérieure donnant un aspect de « bouche de carpe », caractéristique de la maladie. Sur la photo de droite, la patiente atteinte de la forme adulte de la DM1 présente une faiblesse et une atrophie des muscles de la face ainsi qu'un affaissement des paupières supérieures (ptosis) (Machuca-Tzili *et al.*, 2005).

1.2. Caractéristiques génétiques

1.2.1. Généralités

La mutation causale de la DM1, identifiée en 1992, est caractérisée par une répétition instable du triplet CTG au niveau de l'exon 15 du gène *DMPK*, localisé sur le chromosome 19 (locus 19q13.3). C'est le nombre de répétitions qui est le facteur déterminant de cette pathologie. En effet, les sujets sains ne présentent que 5 à 37 répétitions alors que chez les patients DM1, ce nombre est compris entre 50 et 2500. De plus, même si la corrélation n'est pas parfaite, nous observons une accentuation de la sévérité de la maladie ainsi qu'une apparition de plus en plus précoce avec l'augmentation des répétitions.

1.2.2. Instabilité et anticipation génétique

Une maladie présente une anticipation génétique si la transmission de son gène mutant au cours des générations entraîne une apparition plus précoce des symptômes ainsi qu'une augmentation de leur sévérité. Le phénomène d'anticipation est une caractéristique supplémentaire qui distingue la DM1 des autres dystrophies musculaires (Figure 2). Ce phénomène a été décrit pour la première fois en 1918, précisément dans la DM1, avant d'être détecté dans diverses pathologies héréditaires dont la majorité présentait des troubles neurologiques comme la maladie de Huntington, les ataxies (plusieurs spinocérébelleuses et celle de Friedreich), ou encore le syndrome de l'X fragile (Harper *et al.*, 1992; Howeler *et al.*, 1989). C'est l'identification des mutations de l'ensemble de ces pathologies dans le début des années 1990 (Brook *et al.*, 1992; Group, 1993; Verkerk *et al.*, 1991), à savoir une extension de répétitions de triplets sur un unique gène, qui a permis de comprendre que l'anticipation génétique résultait de la présence de ces répétitions de triplets rendant l'ADN (acide désoxyribonucléique) instable.

Dans la DM1, il existe également une influence du sexe du parent transmetteur dans le phénomène d'anticipation (Lavedan *et al.*, 1993). Des travaux épidémiologiques ont montré que la mutation est plus instable chez la descendance lorsqu'elle est transmise par le père que lorsqu'elle est transmise par la mère (Brunner *et al.*, 1993). Généralement, si le nombre de triplets est inférieur à 100, l'amplification est plus importante dans le cas d'une transmission paternelle. En revanche, au dessus de 500 CTG, les répétitions n'augmentent que si la transmission est maternelle et elles ont tendance à diminuer si elle est paternelle (Ashizawa *et al.*, 1994; Cobo *et al.*, 1993b). Ceci pourrait s'expliquer par un mécanisme de sélection lors de la spermatogenèse qui éliminerait les cellules portant de grandes expansions (Brunner *et al.*, 1993). Il existe cependant des cas de formes congénitales transmises par le père, mais cela reste une exception (Di Costanzo *et al.*, 2009; Zeesman *et al.*, 2002). De plus, l'expansion du nombre de répétitions CTG ne peut pas être parfaitement prédite. En effet, l'instabilité

conférée par les répétitions CTG est si grande qu'il a été décrit un nombre différent de répétitions chez des enfants jumeaux (Lopez de Munain *et al.*, 1994).



Figure 2 : Présentation clinique du phénomène d'anticipation. La mère atteinte de la forme adulte et ses deux enfants atteints de la forme congénitale de la DM1 (Schara et Schoser, 2006).

Ces différences dans le nombre de répétitions se retrouvent également entre les différents tissus d'un même patient, et au sein d'un même tissu. On parle alors de mosaïcisme. La comparaison du degré d'expansion des répétitions dans différents tissus d'embryons a révélé que celles-ci étaient plus importantes dans les muscles que dans la peau et le cerveau, et donc que ce mosaïcisme ne reflétait pas le nombre de divisions cellulaires de chaque lignage au cours du développement. De plus, elle montre que le nombre de répétitions commencerait à augmenter entre la 13^{ème} et la 16^{ème} semaine de gestation (Martorell *et al.*, 1997).

Plusieurs études ont montré l'implication plus ou moins directe des protéines de réparation des mésappariements, les protéines mismatch repair (MSH), sur la transmission des expansions CTG. Ainsi, l'association de MSH2 à MSH3 serait impliquée dans l'expansion somatique et intergénérationnelle (Foiry *et al.*, 2006; Savouret *et al.*, 2003; Savouret *et al.*, 2004; Tome *et al.*, 2009). Par exemple, l'inactivation du gène Msh2 dans un modèle de souris Knock-out (KO) Msh2 semble permettre une contraction des répétitions CTG (Savouret *et al.*, 2003).

1.3. Mécanismes physiopathologiques

Le(s) mécanisme(s) d'action par le(s)quels les triplets CTG induisent le phénotype pléiotrope caractéristique de la DM1 a longtemps été controversé et a fait l'objet de plusieurs hypothèses.

1.3.1. Haploinsuffisance en *DMPK*

L'hypothèse de l'haploinsuffisance de la *DMPK* repose sur une étude montrant la diminution d'expression d'ARNm et de la protéine *DMPK* dans des muscles DM1 (Fu *et al.*, 1993). En effet, bien que les répétitions de triplets localisés dans la région 3'UTR du gène *DMPK* n'altèrent pas la phase codante de ces ARNm, elles ne permettent pas la sortie et donc la traduction des ARNm *DMPK* mutants dans le cytoplasme, ce qui entraîne une diminution globale de la protéine dans les tissus affectés. Comme seuls les transcrits normaux de la *DMPK* sont traduits, la quantité de protéine *DMPK* est donc diminuée d'environ de moitié chez les personnes atteintes de la DM1 (Salvatori *et al.*, 2005).

La *DMPK* est une protéine appartenant à la famille des protéine-kinases dépendantes de l'AMP cyclique. Elle présente plusieurs isoformes dont la principale est exprimée dans la majorité des tissus comme les muscles squelettiques et cardiaques qui sont fortement affectés dans la DM1, mais aussi dans les muscles lisses, les os, le cerveau, les poumons, ... (Sarkar *et al.*, 2004). L'homologie de sa structure et une analyse enzymatique suggèrent que la *DMPK* appartient à la famille des kinases Rho et pourrait donc avoir un rôle dans l'organisation du cytosquelette (Jin *et al.*, 2000; Wansink *et al.*, 2003) et dans plusieurs processus cellulaires comme le métabolisme du glucose (Figure 3) (Furukawa *et al.*, 2005; Llagostera *et al.*, 2007; Ridley, 2001).

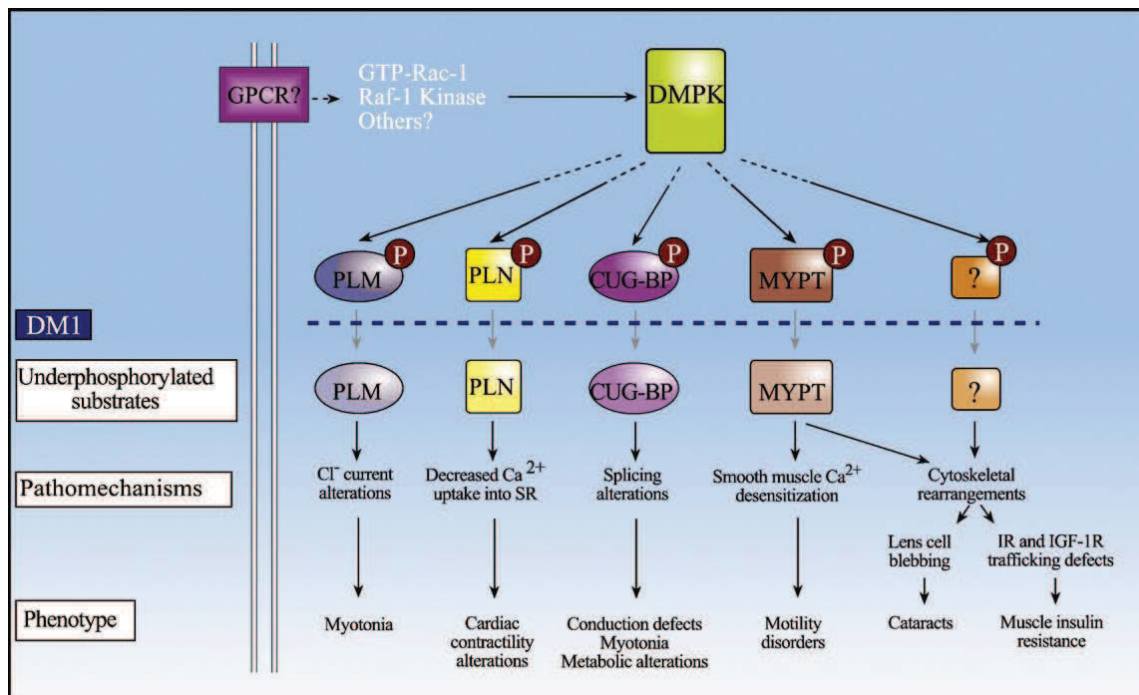


Figure 3 : Eventuelles implications pathologiques de l'activité kinase de la *DMPK* dans la DM1. L'activité kinase de la *DMPK* est induite par la liaison des GTPase Rac-1 et de la kinase Raf-1. Les récepteurs membranaires impliqués dans cette signalisation restent encore inconnus. La phosphorylation des cibles de la *DMPK* est corrélée aux divers changements physiologiques rencontrés dans la DM1. PLM, phospholemman; PLN, phospholamban; MYPT1, Myosin Phosphatase-1; (Kaliman et Llagostera, 2008).

La diminution d'expression du gène porteur de la mutation et de sa protéine DMPK dans les muscles DM1 (Fu *et al.*, 1993), est à la base des premiers modèles murins DM1 qui avaient pour objectif de vérifier si l'inactivation du gène de la DMPK était bien à l'origine de l'ensemble des symptômes observés dans la DM1. Un modèle d'extinction totale de la DMPK, *dmpk* *-/-*, a été développé ne reproduisant que très faiblement les signes pathologiques de la DM1 (Benders *et al.*, 1997; Kaliman *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 1996). En effet, ces souris ne présentent qu'une faible atrophie musculaire ainsi que des défauts de conductions calciques et sodiques au niveau de leurs muscles squelettiques et cardiaques, qui apparaissent tardivement au cours de leur développement. Ces résultats indiquent que l'altération de l'expression de la DMPK n'est pas un élément clef de la maladie mais que la DMPK pourrait avoir un rôle dans le maintien musculaire ainsi que dans la conduction cardiaque. Enfin, la DMPK pourrait intervenir dans les phénomènes de résistance à l'insuline puisque les souris *dmpk* *-/-* présentent une altération de l'assimilation du glucose ainsi qu'un défaut de translocation du récepteur transmembranaire à l'insuline (Llagostera *et al.*, 2007). En accord avec ces résultats, des observations similaires ont également été rapportées dans un modèle murin *dmpk* *-/-* dans lequel la DMPK humaine est surexprimée (Jansen *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996). De la même façon, ces résultats concordent avec les observations cliniques qui montrent que les patients homozygotes pour la mutation DM1 ne diffèrent pas des patients hétérozygotes (Cobo *et al.*, 1993a; Martorell *et al.*, 1996).

1.3.2. Haploinsuffisance des gènes adjacents *SIX5* et *DMWD*

Une seconde hypothèse était basée sur le fait que les répétitions dans la région 3'UTR du gène *DMPK* pouvaient perturber la structure de la chromatine et ainsi l'expression de ses gènes adjacents que sont *DMWD* (Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif) en amont, et *SIX5* (Sine oculis homeobox homolog 5) localisé en aval (Figure 4) et dont un gène homologue chez la drosophile est impliqué dans le développement de l'œil et des muscles distaux des membres (Kumari et Usdin, 2009; Ranum et Day, 2004). Cette piste semblait prometteuse puisque l'expression de ces deux gènes est diminuée en présence des répétitions CTG (Alwazzan *et al.*, 1999; Klesert *et al.*, 1997; Thornton *et al.*, 1997), et qu'ils pouvaient respectivement induire des perturbations du système nerveux et l'apparition de la cataracte observées dans la DM1 (Personius *et al.*, 2005; Westerlaken *et al.*, 2003). Cependant, l'extinction complète du gène *Six5* chez la souris n'aboutit qu'en l'apparition d'une cataracte, sans développement de défauts musculaires (Klesert *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2000).

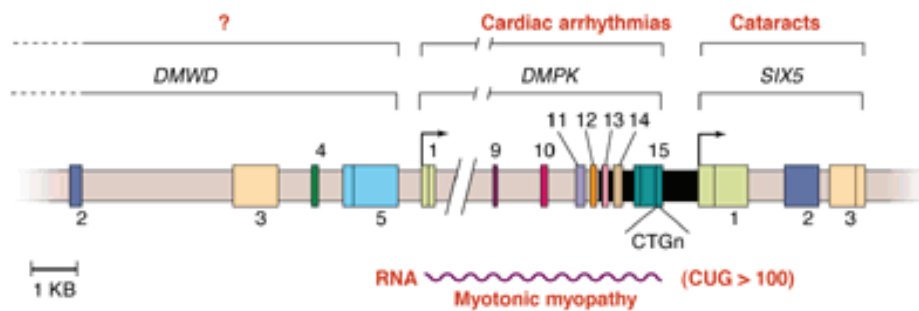


Figure 4 : Représentation schématique du gène *DMPK* et de ses gènes adjacents *DMWD* et *SIX5* (Tapscott, 2000).

En résumé, l'ensemble de ces résultats n'exclut pas l'implication de ces deux gènes dans le développement de certains symptômes. Toutefois, l'haploinsuffisance des gènes environnants, tout comme celle de la *DMPK*, ne permet pas d'expliquer le caractère multisystémique de la DM1. Parallèlement à ces travaux et suite à l'identification d'autres pathologies à triplets telles que l'ataxie spinocérébelleuse de type 8, le syndrome de l'X fragile et la maladie de Huntington (Figure 5), une troisième hypothèse reposant sur le gain de fonction toxique de l'ARN muté a commencé à émerger (Group, 1993; Verkerk *et al.*, 1991).

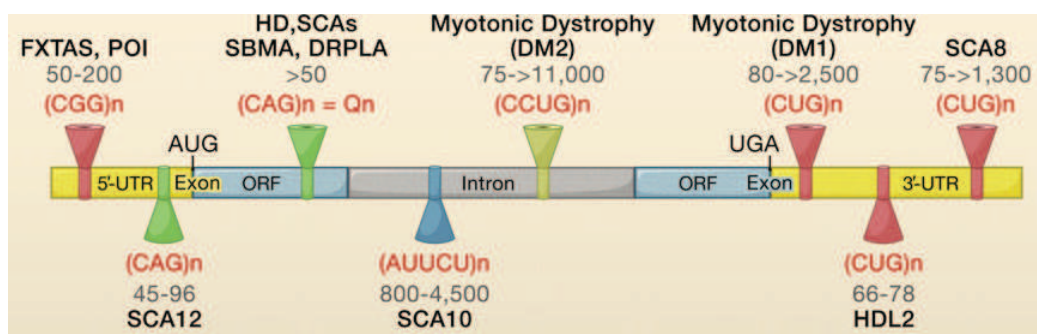


Figure 5 : Pathologies à répétitions présentant un gain de fonction. Indication du type, du nombre de répétitions nucléotidiques et de leur région d'insertion dans le génome (FXTAS, Fragile X-associated tremor ataxia syndrome; POI, premature ovarian insufficiency; HD, Huntington's disease; SCAs, spinocerebellar ataxias; DRPLA, dentatorubral pallidoluysian atrophy; SBMA, spinal and bulbar muscular atrophy; HDL2, Huntington's disease-like 2) (Cooper *et al.*, 2009).

1.3.3. Gain de fonction de l'ARNm toxique

La mise en évidence en 1998, d'une seconde forme de dystrophie myotonique, cliniquement proche de la DM1, mais qui est causée par des répétitions CCTG dans un autre gène que la *DMPK*,

corrèle avec cette hypothèse. En effet, suite à des tests génétiques utilisés pour valider cliniquement le diagnostic de la DM1, il fut montré qu'un faible pourcentage (1 à 2%) de patients présentait de nombreux signes cliniques prononcés pour la DM1, mais ne possédaient pas d'expansion anormale de triplets CTG (Mahadevan *et al.*, 1992). Malgré la présence de symptômes similaires à ceux de la DM1 comme la faiblesse musculaire (toutefois moins sévère), la myotonie, l'apparition précoce d'une cataracte, d'une résistance à l'insuline ou d'une insuffisance testiculaire, les patients souffraient également de douleurs musculaires, affichaient une faiblesse des muscles proximaux et une atrophie des fibres de type II, par opposition à la DM1 où ce sont les muscles distaux et les fibres de type I qui sont affectées (Figure 6). De plus, ces patients ne semblaient pas avoir de faiblesse des muscles de la face ou encore d'atteinte du SNC (Harper, 2001; Vihola *et al.*, 2003). Ces dissemblances majeures avec la DM1 lui ont valu d'être désignée, dans un premier temps, par le nom de myopathie myotonique proximale (PROMM) (Ricker *et al.*, 1994), puis par son appellation actuelle de DM2 depuis la mise en évidence de la mutation qui lui est associée (Liquori *et al.*, 2001). De manière relativement similaire à la DM1, la DM2 résulte d'une expansion anormale de quadruplets CCTG dans le premier intron du gène codant pour la protéine à doigt de zinc 9 (ZNF9) (Ranum *et al.*, 1998). Normalement inférieur à 70 répétitions, les patients DM2 peuvent en présenter jusqu'à 11000 (Day *et al.*, 2003; Liquori *et al.*, 2001).

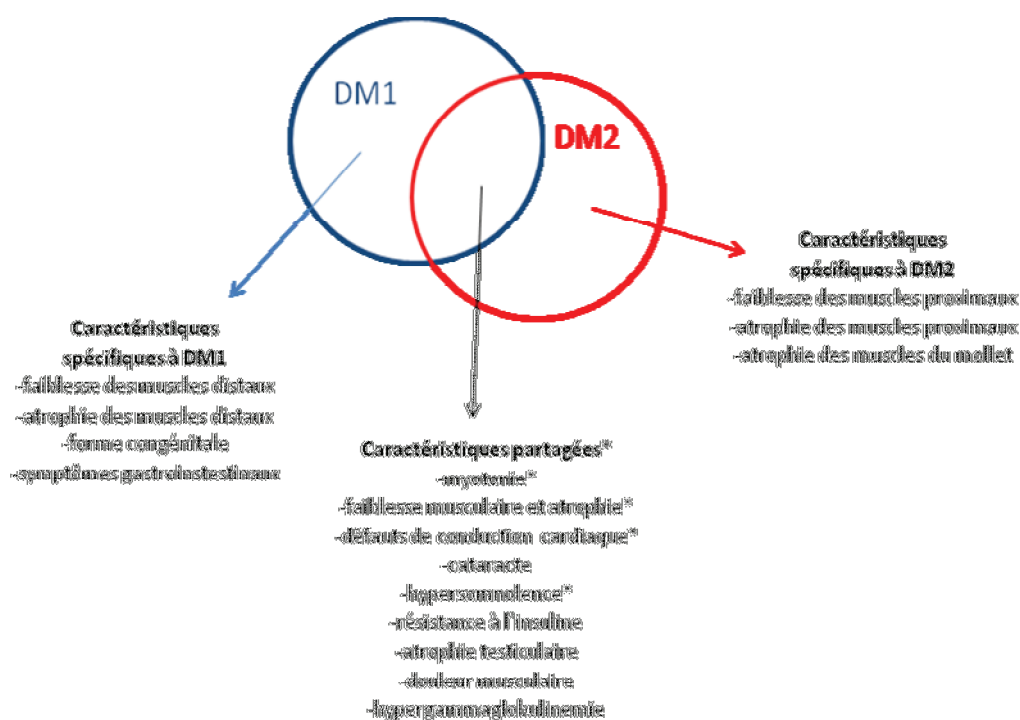


Figure 6 : Caractéristiques cliniques des myotonies dystrophiques. * symptômes présents dans les formes DM2 mais plus proéminents dans la DM1 (Cho et Tapscott, 2007)

Parallèlement, le développement de différents modèles murins de la pathologie a validé cette hypothèse. En effet, Mankodi *et al.* ont démontré, à l'aide d'un modèle murin de la DM1, que l'expression spécifiquement musculaire de 250 répétitions au niveau de la 3' UTR du transgène codant pour l'actine squelettique humaine aboutissait au développement d'un phénotype myotonique (Mankodi *et al.*, 2000). De la même manière, l'expression de plus de 700 répétitions à l'état homozygote chez des souris aboutit à un phénotype sévère (Gomes-Pereira *et al.*, 2007).

En cherchant à mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de ce gain de fonction toxique, il a été montré dans le cadre de la DM1 que les répétitions CUG se replient en boucle et forment une structure double brin par ses interactions GC/CG. Les mésappariements des bases uraciles sont quant à elles à l'origine de la capture de diverses protéines (Mooers *et al.*, 2005). Cette conformation empêche la sortie des ARN mutants vers le cytoplasme et entraîne leur accumulation dans le noyau des cellules (Davis *et al.*, 1997) sous forme d'inclusions ribonucléiques intranucléaires appelées *foci* (Figure 7) (Taneja *et al.*, 1995). Ces inclusions sont également responsables de la séquestration de nombreuses protéines dont certaines sont connues pour être impliquées dans le processus d'épissage alternatif, tel que la protéine muscleblind1 (MBNL1). De façon intéressante, l'expression de la mutation DM2 est également associée à la formation de *foci* nucléaires qui séquestrent MBNL1 (Fardaei *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2001).



Figure 7 : Visualisation de *foci* nucléaires dans des myoblastes. Les répétitions CUG de l'ARN mutant sont marquées en rouge par FISH grâce à une sonde (CAG)₃₀-Cy3. Les noyaux sont visualisés après marquage au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole). (C) myoblastes de sujets sains, (D) myoblastes de patients DM1 faiblement atteints (~150 CTG), (B) myoblastes de patients DM1 plus fortement affectés (Davis *et al.*, 1997).

L'ensemble de ces données privilégie donc l'hypothèse de gain de fonction de l'ARN mutant en tant que mécanisme physiopathologique majeur pour expliquer le caractère multisystémique de la DM1. En particulier, l'altération de la fonction de protéines de liaison à l'ARN et donc consécutivement l'altération de la maturation des ARNm semble jouer un rôle majeur dans le développement de cette pathologie.

1.4. Altération de la maturation des ARNm

1.4.1. Altération des protéines de fixation aux ARNs

Les protéines de liaison aux ARNs, dont le nombre s'élève à plus de 500 chez l'homme, interviennent à tous les stades de la maturation des pré-ARNm en ARNm, qui débutent dans le noyau et finissent dans le cytoplasme (Hinman et Lou, 2008; Lukong *et al.*, 2008). Elles peuvent aussi bien être impliquées dans la modification des ARNm par conversion de nucléotides, que dans leur polyadénylation, leur export dans le cytoplasme, ou encore dans leur stabilité en se fixant au niveau de motifs situés dans leur région 3'UTR. Ces protéines sont également impliquées dans les phénomènes de traduction et d'épissage alternatif (Glisovic *et al.*, 2008).

Comme mentionné préalablement, il existe une liste croissante de protéines de liaison à l'ARN dont le niveau d'expression ou la fonction sont modifiés en association avec la DM1. Ainsi, dans la recherche de protéines potentiellement impliquées dans l'effet des expansions de triplets, deux familles ont retenu l'attention pour leur capacité à se lier à des motifs CUG *in vitro*. Il s'agit des membres des familles CELF (CUG Binding Protéin 1 et ETR3) et MBNL1 pour lesquelles un défaut du niveau d'expression ainsi qu'une association au niveau des *foci* ont respectivement été démontrés (Fardaei *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004; Mankodi *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1997; Savkur *et al.*, 2001; Timchenko *et al.*, 2001a; Timchenko *et al.*, 1999). Le facteur d'épissage hnRNPH dont l'augmentation a été mis en évidence dans des myoblastes immortalisés de patients DM1 co-localise également avec les *foci* (Paul *et al.*, 2006). Dans la mesure où la contribution physiopathologique des protéines MBNL1 et CUGBP1 a été plus particulièrement étudiée, nous focaliserons notre intérêt sur ces facteurs.

1.4.1.1. CUGBP1

Le gain de fonction toxique des ARNm dans la DM1 a également été mis en évidence avec l'identification de l'accumulation de la protéine CUGBP1 au niveau des noyaux des cellules de muscles squelettiques de patients DM1 (Savkur *et al.*, 2001; Timchenko *et al.*, 2001a). CUGBP1 appartient à une famille de six gènes qui codent des protéines impliquées dans la régulation de plusieurs processus post-transcriptionnels comme l'épissage alternatif, l'édition et la stabilité des ARN, ou encore l'initiation de la traduction (Anant *et al.*, 2001; Ladd *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2003; Timchenko *et al.*, 1999). Également connue sous le nom hNab50, CUGBP1 ne se lie qu'aux séquences CUG des ARNs simple brin (Roberts *et al.*, 1997; Timchenko *et al.*, 1996; Timchenko *et al.*, 2001a). Du fait de cette propriété, sa fixation n'est pas proportionnelle au nombre de répétitions dans la DM1 puisqu'elle ne peut pas s'accrocher à la structure en épingle à cheveux formée par les

ARNm *DMPK* mutés. Il est donc normal que CUGBP1 ne colocalise pas avec les *foci*, tout comme CUGBP2 (ETR3 ou CELF2) ou les autres membres des protéines CELF (Jiang *et al.*, 2004).

Dans la DM1, les répétitions CTG sont responsables de l'augmentation de la demi-vie de CUGBP1 par stabilisation de sa structure (Davis *et al.*, 1997; Mahadevan *et al.*, 2006; Savkur *et al.*, 2001; Timchenko *et al.*, 2001a). Cette protéine qui est ubiquitairement exprimée, est présente sous deux formes phosphorylées dans le noyau et le cytoplasme des cellules. Au niveau des cellules DM1, CUGBP1 voit cette distribution tendre vers une accumulation de sa forme hyperphosphorylée dans le noyau des cellules dystrophiques (Roberts *et al.*, 1997; Timchenko *et al.*, 2001a; Timchenko *et al.*, 1999). La protéine kinase C (PKC), dont une hyperactivation a été retrouvée dans les muscles cardiaques de patients DM1 ainsi que dans des souris transgéniques DM1, participerait à la stabilisation de CUGBP1 en l'hyperphosphorylant (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). L'augmentation d'activité nucléaire de CUGBP1, normalement diminuée dans les muscles cardiaques et squelettiques peu après la naissance, (Ladd *et al.*, 2005), entraîne une mauvaise régulation de l'épissage alternatif des gènes codant la troponine cardiaque (*cTNT*), le récepteur à l'insuline (*IR*), et le canal chlore musculaire (*ClC-1*) (Tableau2) (Charlet *et al.*, 2002; Philips *et al.*, 1998; Savkur *et al.*, 2001).

Epissage alternatif	→ <i>cTNT</i> → <i>InsR</i> → <i>ClC1</i>	Charlet <i>et al.</i> , 2002; Ho <i>et al.</i> , 2005; Kalsotra <i>et al.</i> , 2008; Koshelev <i>et al.</i> , 2010; Mankodi <i>et al.</i> , 2002; Philips <i>et al.</i> , 1998
Traduction	→ p21 → Mef2A (Myocyte enhancer factor 2A)	Timchenko <i>et al.</i> , 2001; Timchenko <i>et al.</i> , 2004
Stabilité	→ c-Fos → TNF	Moraes <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2008

Tableau 2 : Résumé des différentes anomalies associées à la dérégulation de l'expression de CUGBP1.

Différentes études ont montré que la modulation d'expression de CUGBP1 reproduisait différents phénotypes de la DM1. Ainsi, des souris transgéniques qui surexpriment CUGBP1 dans les muscles squelettiques et le cœur présentent un taux de mortalité d'autant plus élevé que l'expression de CUGBP1 est importante (Ho *et al.*, 2005; Timchenko *et al.*, 2004). Les souris qui survivent présentent un retard de croissance avec plusieurs défauts histologiques des muscles squelettiques. A l'inverse, les

souris KO pour CUGBP1 ont des anomalies cardiaques qui sont très atténuées par la restauration du niveau d'expression de la protéine (Ladd *et al.*, 2005). Chez la drosophile, la sous-expression de CUGBP1 atténue la dégénérescence et la perte musculaires dues aux expansions de triplets, tandis que sa surexpression aggrave ces phénotypes (de Haro *et al.*, 2006).

En plus de son rôle dans la régulation de l'épissage alternatif, les modulations du niveau d'expression de CUGBP1 observées dans la DM1 affecteraient également ses fonctions cytoplasmiques. Ainsi il a été suggéré que CUGBP1 contrôlerait l'efficacité de traduction de l'ARNm codant pour p21 en se fixant à sa région 5'UTR. Consécutivement, une diminution de la traduction de p21 due à une baisse cytoplasmique de CUGBP1 a été associée à un défaut de la différenciation myogénique dans la DM1 (Timchenko *et al.*, 2001b). Plus récemment, différentes études ont montré que les modulations du niveau d'expression de CUGBP1 dans la DM1 aboutissaient à des anomalies de stabilité des ARNm codant pour le TNF (pour Tumor Necrosis Factor), entraînant ainsi une augmentation de l'expression de ce facteur. Bien que cette contribution pathologique ne soit pas clairement démontrée, les auteurs de ces études postulent que la modulation d'expression du TNF pourrait participer à différents phénotypes de la DM1 comme la dégénérescence musculaire ou l'insulino-résistance (Zhang *et al.*, 2008). Par le biais de sa fonction de déadénylation, CUG-BP1 modifierait la stabilité des ARNm du TNF. Démonstré dans un premier temps chez le Xénope puis vérifié par la suite chez l'Homme (Paillard *et al.*, 2003), CUGBP1 entraîne la dégradation des transcrits en affectant la longueur de leur queue poly(A) après s'être fixé au niveau des séquences ARE (Element Rich en GU) (Moraes *et al.*, 2006; Vlasova *et al.*, 2008).

De façon similaire, le facteur ETR3 qui appartient à la même famille de protéine que CUGBP1, est sujet à une dérégulation dans la DM1. Des souris transgéniques exprimant de manière inductible des expansions de triplets CTG dans le cœur montrent une augmentation du niveau protéique de ETR3 après l'induction des CTG (Wang *et al.*, 2007). Ce modèle montre également que les expansions de triplets modifient la localisation cellulaire du facteur ETR3, qui se concentre au niveau nucléaire (Wang *et al.*, 2007). Enfin, ETR3 régule l'épissage alternatif de plusieurs transcrits altérés dans la DM1, tels que cTNT, l'homologue à la myotubularine (MTMR1), l'IR, le récepteur 1 de la N-méthyl-D-aspartate (NMDAR1) et Tau (Faustino et Cooper, 2005; Ladd *et al.*, 2001; Leroy *et al.*, 2006).

En conclusion, ces différentes études démontrent l'implication des facteurs CELF, et plus particulièrement de CUGBP1 dans la DM1 (Tableau 2).

1.4.1.2. MBNL1

Comme il a été décrit précédemment, le facteur d'épissage MBNL1 est séquestré au niveau des *foci* (Fardaei *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2000; Squillace *et al.*, 2002) après s'être lié par ses bases GC, à la structure en épingle des ARNm contenant les répétitions CTG (Napierala et Krzyzosiak, 1997). Ainsi, la perte de fonction de MBNL1, est corrélée au nombre de répétitions CTG et à la sévérité de la maladie (Miller *et al.*, 2000). L'implication physiopathologique de MBNL2, un autre membre de la famille MBNL qui est également séquestré au niveau des *foci* (Figure 8) (Fardaei *et al.*, 2002; Holt *et al.*, 2009; Mankodi *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2000), dans la DM1 reste encore discutée dans la mesure où les conséquences de l'altération de son activité sont moindres que celles de MBNL1 puisque les souris *Mbnl2* *-/-* ne présentent qu'un phénotype modéré incluant seulement une fibrose musculaire (Hao *et al.*, 2008).

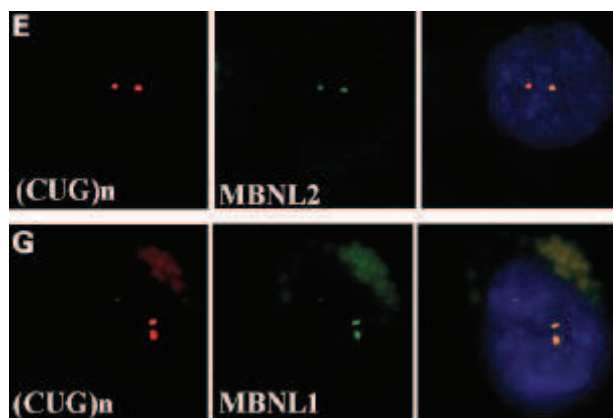


Figure 8 : Colocalisation de MBNL1 et MBNL2 au niveau de cellules DM1. Les répétitions CUG de l'ARN mutant sont marquées en rouge par FISH grâce à une sonde (CAG)₃₀-Cy3 et les protéines MBNL ont été détectées par immunomarquage. Les noyaux sont visualisés après marquage au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (Jiang *et al.*, 2004).

Identifié dans un premier temps chez la Drosophile, MBNL1 a été décrite pour son implication dans la différenciation terminale des cellules musculaires et des photorécepteurs (Artero *et al.*, 1998; Begemann *et al.*, 1997). De part ces fonctions et en se basant sur sa perte fonctionnelle résultant de sa séquestration nucléaire, un modèle de souris transgénique *Mbnl1* *-/-* a été créé afin de vérifier si ces souris reproduisaient l'ensemble des caractères physiopathologiques associés à la DM1. Contrairement aux observations dans la DM1, les souris *Mbnl1* *-/-* ne présentent pas une augmentation de l'expression de CUGBP1. Néanmoins, elles développent des troubles musculaires et oculaires, ainsi que des anomalies d'épissages caractéristiques de la DM1 tels que le défaut de la troponine musculaire squelettique *Tnnt3* (*fast skeletal muscle troponin T3*) (Kanadia *et al.*, 2003). A l'aide d'un système de minigène, il a été démontré par la suite qu'en se fixant directement sur des séquences introniques, MBNL1 pouvait réguler l'épissage alternatif de la *cTNT* et de l'*IR* (Ho *et al.*, 2004). Par conséquent, le

gain de fonction induit dans la DM1 par la séquestration de MBNL1 par les ARNm mutés empêcherait cette protéine d'être fonctionnelle et de remplir son rôle dans l'épissage alternatif (Figure 9).

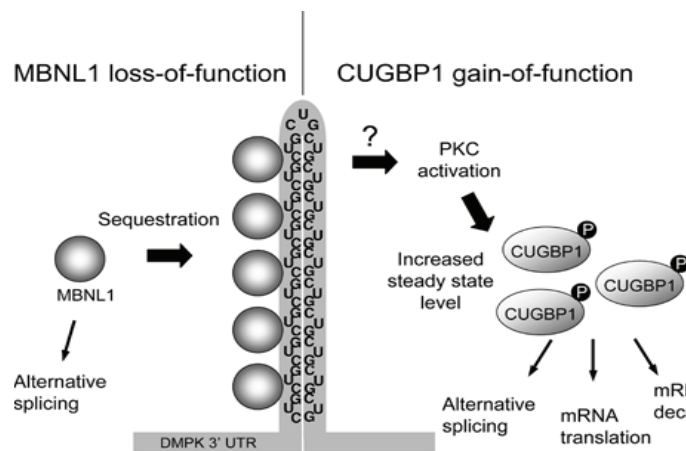


Figure 9 : Gain de fonction de CUGBP1 et perte de fonction de MBNL1 induits par les répétitions CUG, responsables de la dérégulation de l'épissage alternatif. MBNL1 est séquestré au niveau de la structure double brin en épingle à cheveux formée par les répétitions CUG. Celles-ci stimulent également l'activation de la PKC qui induit la stabilisation de CUGBP1 en l'hyperphosphorylant (Lee et Cooper, 2009).

La relation directe entre la perte de fonction de MBNL1 et la régulation de l'épissage a été confirmée dans une deuxième approche complémentaire dans laquelle MBNL1 a été surexprimée dans les muscles squelettiques de souris exprimant spécifiquement des répétitions CTG en 3' du gène codant pour l'actine squelettique humaine (human skeletal actine long repeat : HSA^{LR}) (Kanadia *et al.*, 2006). Les résultats de cette étude montrent une réversion de la myotonie ainsi que la restauration de défauts d'épissage comme celui du canal chlore musculaire *CIC-1* ou *Tnnt3*.

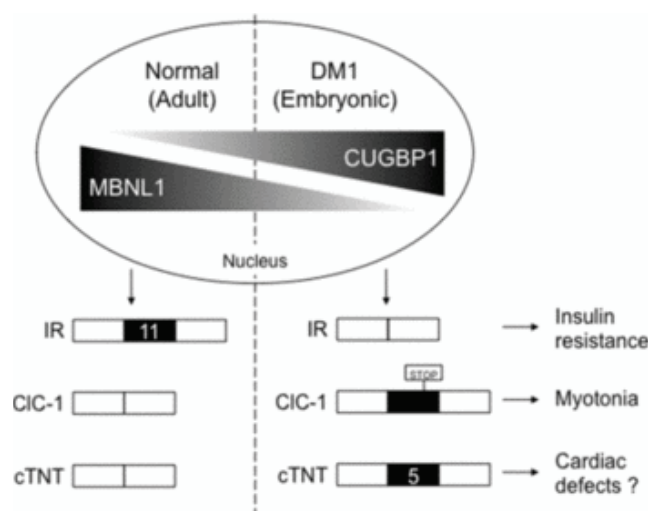


Figure 10 : Les niveaux nucléaires de MBNL1 et CUGBP1 contrôlent un certain nombre d'épissages alternatifs qui sont normalement régulés durant le développement (Lee et Cooper, 2009).

Ainsi, dans la DM1, les répétitions CTG portées par les ARNm *DMPK* mutés sont à la fois responsables de la perte de fonction de MBNL1, protéine qui est normalement à l'origine de la transition des isoformes fœtales vers les isoformes adultes, et d'un gain de fonction de CUGBP1 qui au contraire favorise la rétention de l'isoforme fœtale (Figure 10) (Lee et Cooper, 2009; Mankodi, 2008).

1.4.2. Défaut de l'épissage alternatif

1.4.2.1. L'épissage alternatif

D'après le Consortium International de Séquençage du Génome Humain de 2004, le génome humain contiendrait entre 20000 et 25000 gènes. En revanche, ces derniers exprimeraient plusieurs centaines de milliers de protéines. Cette diversification de protéines produites, dans de multiples types cellulaires et à différents temps du développement, résulterait en grande partie d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle touchant plus de 74% des gènes, l'épissage alternatif (Figure 11) (Johnson *et al.*, 2003; Nilsen et Graveley).

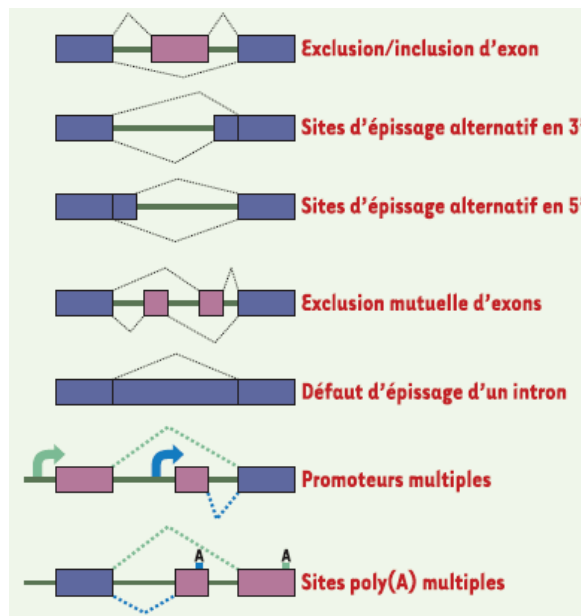


Figure 11 : Schéma illustrant les différents types d'épissage alternatif. Les exons constitutifs sont représentés en bleu, les exons alternatifs en violet, et les introns par des traits pleins (Corcos et Solier, 2005).

L'épissage alternatif est un procédé qui produit plusieurs ARNm à partir d'un seul pré-ARNm à condition que ce dernier possède à la fois sur sa séquence nucléotidique les sites d'épissage donneur en 5' et accepteur en 3', situés aux jonctions exon-intron, ainsi que le site de branchement, localisé en amont du site 3' accepteur. Ces sites permettent la catalyse de l'excision de leurs introns et la suture de

leurs exons par le spliceosome (Figure 12). Ce dernier est un complexe macromoléculaire localisé dans le noyau des cellules, qui a pour rôle de s'associer à l'ARN pré-messager, après reconnaissance des sites d'épissage, et de coupler les étapes d'élimination des introns et de re-ligation des exons par deux réactions de trans-estérification. Il constitue donc un élément indispensable dans la maturation des messagers et leur export vers le lieu de leur synthèse protéique dans le cytoplasme.

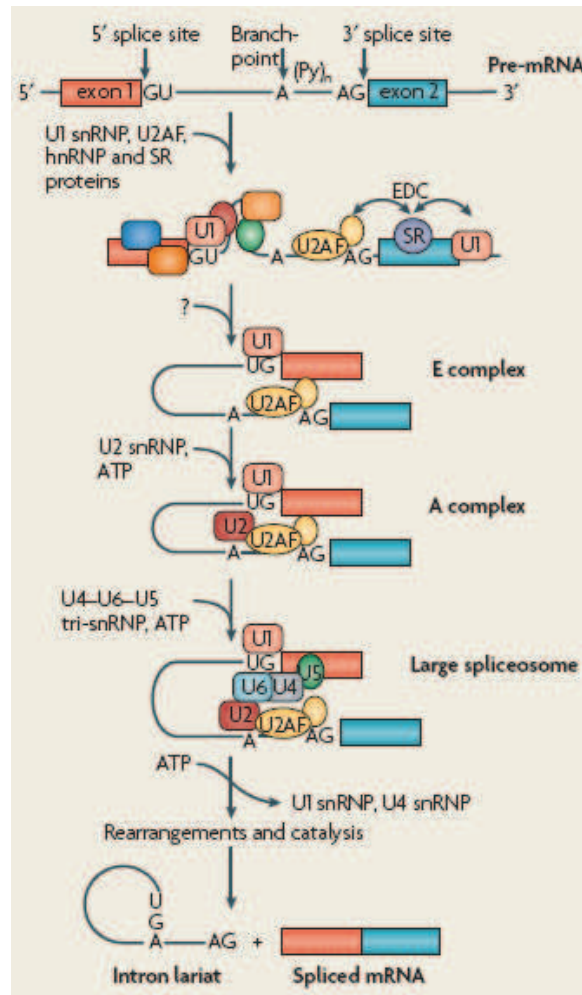


Figure 12 : Epissage d'un intron par le spliceosome. Le processus d'épissage est un mécanisme dynamique qui suit une succession précise d'événements au cours de laquelle les différents snRNP (U1, U2, U4, U5 et U6) s'assemblent et se désassemblent du spliceosome. Tout d'abord, U1 s'associe à la jonction 5' de l'intron alors que U2 s'associe à la boîte de branchement. Le complexe U4-U6-U5 rapproche U1 et U2, réalisant ainsi un pont entre la jonction 5' de l'intron et la boîte de branchement (bords 3'). U4 et U1 quittent alors le complexe. Le 2'-OH du A de la boîte de branchement coupe la jonction 5' de l'intron, et le 3'-OH du nucléotide en 3' de l'exon en amont coupe l'autre jonction. L'ARNm épissé est ainsi libéré avec l'intron en "lasso" (Li *et al.*, 2007).

Plusieurs familles de protéines jouent un rôle majeur dans ce processus en reconnaissant les sites spécifiques d'un pré-ARNm, généralement situés quelques centaines de nucléotides en amont du site d'épissage. Parmi elles, on peut citer les protéines hnRNP, les protéines SR riches en sérines et en arginines, et les protéines CELF (Tableau 3).

Class	Function	Examples*
SR and SR-related proteins	Typically activate splicing, by recruiting components of the splicing machinery	nSR100 (SRRM4), SC35, SF2 (ASF), SRM160 (SRRM1), SRp30c, SRp38, SRp40, SRp55, SRp75, TRA2 α , TRA2 β
hnRNPs	Typically repress splicing, by a variety of poorly understood mechanisms	hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP C, hnRNP F, hnRNP G (RBMX), hnRNP H, hnRNP L, nPTB (PTBP2), PTB (PTB1)
Other RNA-binding proteins	Activate or repress splicing U1 snRNP is essential for constitutive splicing but can also repress splicing	CELF4 (BRUNOL4), CUGBP, ESRP1, ESRP2, FOX1 (A2BP1), FOX2 (A2BP2), HuD, MBNL1, NOVA1, NOVA2, PSF (SPFQ), quaking, SAM68 (KHDRBS1), SLM2 (KHDRBS3), SPF45 (RBM17), TIA1, TIAR (TIAL1), U1 snRNP

*Synonyms are listed in parentheses.

Tableau 3 : Exemples de protéines impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif
(Nilsen et Graveley).

De plus en plus de travaux montrent que l'épissage alternatif a un rôle déterminant sur la vie et le devenir de la cellule (Nilsen et Graveley). En effet, la production de multiples isoformes à partir d'un même pré-ARNm peut entraîner la production de protéines ayant des rôles subtilement différents à antagonistes. La physiologie de la cellule peut donc en partie être régulée par l'expression d'ARNm ayant subi un épissage alternatif puisque certaines isoformes peuvent être exprimées à un stade de développement particulier, dans un type cellulaire spécifique ou encore suite à une modification de l'environnement cellulaire (Lewis *et al.*, 2003). Consécutivement à l'implication de ce processus dans le devenir de la cellule, un grand nombre de pathologies humaines ont été associées à une altération de la régulation de l'épissage alternatif (Tableau 4) (Kuyumcu-Martinez et Cooper, 2006).

Mutations en cis	Maladie	Fonction de la protéine sauvage	Numéro OMIM*
PBGD	Porphyrie intermittente aiguë	Synthèse de l'hème	17600
BRCA1	Cancer du sein et de l'ovaire	Prolifération cellulaire, composant de l'ARN pol II	113705
PMM2	Syndrome de Jaeken	Synthèse de GDP-mannose	212065
CFTR	Fibrose kystique	Canal chlore	602421
Lysyl-hydroxylase	Syndrome de Ehlers-Danlos du collagène	Formation d'hydroxylysines	153454
FANCG	Anémie de Fanconi	Réparation de l'ADN	227650
HPRT	Syndrome de Lesch-Nyhan	Métabolisme de l'ADN	308000
Pyruvate déshydrogénase E1 α	Encéphalomyéopathie de Leigh	Métabolisme du pyruvate	312170
Fibrilline-1	Syndrome de Marfan	Constituant des microfibrilles	134797
NF1	Neurofibromatose de type 1	Inhibiteur de la voie Ras	162200
OCT	Hyperammoniémie	Cycle de l'urée	300461
UPC	Porphyrie cutanée	Métabolisme des porphyrines	176000
Hexosaminidase	Maladie de Sandhoff	Métabolisme des gangliosides	606869
Adénosine désaminase	Immunodéficience combinée sévère	Métabolisme de l'adénosine	102700
FAH	Tyrosinémie de type 1	Métabolisme de la tyrosine	276700

Tableau 4 : Exemples de gènes portant des mutations d'épissage associées à des pathologies humaines (Corcos et Solier, 2005).

Ainsi, les anomalies d'épissage représentent 10% des mutations rapportées dans la Human Gene Mutation Database, ce qui est certainement sous-estimé, car seules les mutations affectant les sites donneurs et accepteurs d'épissage sont prises en compte (Corcos et Solier, 2005).

1.4.2.2. L'épissage alternatif dans la DM1

Contrairement aux maladies résultant de la présence d'une mutation dans un exon (ex : la mucoviscidose), ou au niveau de la jonction exon-intron d'un gène (ex : certains cas de β -thalassémie), ce qui peut entraîner la modification de la fonction primaire d'une protéine par une simple substitution d'un acide aminé, par l'apparition prématuré d'un codon stop ou encore par la non excision d'une séquence intronique, la mutation responsable de la DM1, localisée dans une région non codante, affecte une partie de la régulation du processus d'épissage alternatif en perturbant la fonctionnalité de protéines de liaison à l'ARN.

Consécutivement, la grande majorité des études mécanistiques de la DM1 se sont essentiellement concentrées sur la mise en évidence de défauts d'épissage. L'identification des premiers défauts d'épissage associés à la DM1 s'est basée sur une approche « gène candidat », c'est-à-dire que les études se sont focalisées sur les gènes pouvant facilement être reliés au développement de certains symptômes de la DM1. Ces premières études ont à la fois permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires reliant la présence des répétitions CTG aux processus d'épissage et de

laisser entendre que la DM1 est une pathologie développementale dans la mesure où ces défauts d'épissage étaient dans l'ensemble associés à un défaut de passage de la forme fœtale à la forme adulte (Figure 13) (Ho *et al.*, 2004; Ranum et Cooper, 2006).

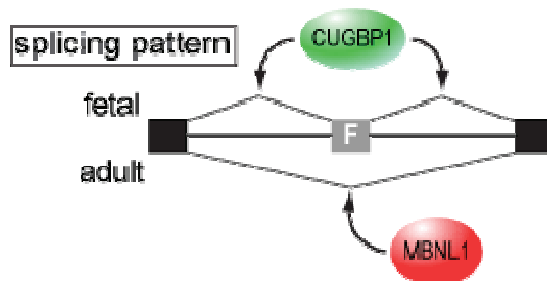


Figure 13 : L'inversion du taux d'expression nucléaire de MBNL1 et de CUGBP1 est responsable de la production d'isoformes fœtales chez les patients DM1.

A titre d'illustration, une vingtaine de gènes ont ainsi été décrits comme présentant des anomalies d'épissage dans les muscles squelettiques et cardiaques ainsi que dans le système nerveux de patients affectés par la DM1 (Tableau 5).

Bien qu'il soit encore difficile à ce jour d'évaluer exactement l'impact de la mutation DM1 sur le processus d'épissage alternatif, le développement récent de techniques à large échelle, telle que la technique de puces à exons, a permis d'élargir considérablement la liste des pré-ARNm dont l'épissage alternatif est modifié dans la DM1 (Du *et al.*). Ainsi, une étude récente, basée sur ce type de technique a permis de révéler plus de 200 défauts d'épissage au niveau des muscles de souris transgéniques HSA^{LR}. De façon intéressante, la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus à partir des souris *MBNL*^{3/3} semble indiquer que la perte de fonction de la protéine MBNL1 serait à l'origine de plus de 80% de ces altérations, suggérant un rôle prépondérant de cette protéine dans les anomalies d'épissage associées à la DM1 (Du *et al.*). Cependant, les contributions physiopathologiques de ces altérations restent encore pour beaucoup à être déterminées.

Parmi l'ensemble des défauts d'épissage associés à la DM1, deux exemples seront plus particulièrement décrits dans la mesure où ils ont permis d'avancer considérablement dans la compréhension des mécanismes moléculaires reliant l'expression de répétitions CTG, les protéines MBNL1 et CUGBP1 et l'épissage alternatif. Le premier correspond au défaut d'expression du récepteur à l'insuline (IR) et le deuxième à celui affectant l'expression du canal chlore spécifique aux muscles (ClC-1). Par ailleurs, ces deux exemples illustrent très bien l'approche « gène candidat » mentionnée précédemment, à savoir la recherche d'anomalie de gènes pouvant être impliqués dans l'apparition de certains symptômes. Certains défauts d'épissage affectant des gènes spécifiques du

système nerveux central (SNC) et illustrant le caractère pléiotrope de la pathologie DM1 seront également détaillés.

<i>Tissus</i>	<i>Gènes</i>	<i>Exon/intron</i>	<i>Inclusion/exclusion</i>	<i>Références</i>
muscle squelettique	<i>insulin receptor (INSR)</i>	exon 11	exclusion	Savkur <i>et al.</i> , 2001
	<i>chloride channel (CLCN-1)</i>	intron 2	inclusion	Charlet <i>et al.</i> , 2002; Mankodi <i>et al.</i> , 2002
		exon 7a	inclusion	
	<i>fast skeletal troponin T (TNNT3)</i>	foetal exon	inclusion	Kanadia <i>et al.</i> , 2003
	<i>ryanodine receptor (RyR)</i>	exon 70 (AS I)	exclusion	Kimura <i>et al.</i> , 2005
	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1 (SERCA1)</i>	exon 22	exclusion	Kimura <i>et al.</i> , 2005
	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 2 (SERCA2)</i>	intron 19	inclusion	Kimura <i>et al.</i> , 2005
	<i>LIM domain binding 3 (LBB3, ZASP)</i>	11	inclusion	Lin <i>et al.</i> , 2006
	<i>titin (TTN)</i>	Zr4	inclusion	
		Zr5	inclusion	
	<i>nebulin-related anchoring protein (NRAP)</i>	12	inclusion	
	<i>calpain 3, CAPN3</i>	16	exclusion	
	<i>attractin-like 1 (ATRNL1, ALP)</i>	5a	exclusion	
		5b	exclusion	
	<i>formin homology 2 domain containing 1 (FHOD1, FHOS)</i>	11a	exclusion	
	<i>glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 (GFPT1, GFAT1)</i>	10	exclusion	
	<i>muscleblind 1 (MBNL1)</i>	7	inclusion	
	<i>muscleblind 2 (MBNL2)</i>	7	inclusion	
	<i>nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor (NFIX))</i>	123	inclusion	Du <i>et al.</i> , 2010
	<i>SET and MYND domain containing 1 (SMYD1)</i>	39	inclusion	
	<i>sperm associated antigen 9 (SPAG9)</i>	39	exclusion	
	<i>gènes de la matrice extracellulaire</i>			
muscle squelettique et cœur	<i>myotubularin-related protein 1 (MTMR1)</i>	exon 2.1	exclusion	Buj-Bello <i>et al.</i> , 2002; Ho <i>et al.</i> , 2005a
		exon 2.3	exclusion	
	• <i>-dystrobrevin (DTNA)</i>	exon 11a	inclusion	Nakamori <i>et al.</i> , 2008
		exon 12	inclusion	
cœur	<i>cardiac troponin T (TNNT2)</i>	exon 5	inclusion	Philips <i>et al.</i> , 1998
cerveau	<i>tau (MAPT)</i>	exon 2	exclusion	Sergeant <i>et al.</i> , 2001
		exon 3	exclusion	
		exon 10	exclusion	Jiang <i>et al.</i> , 2004
	<i>N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1)</i>	exon 5	inclusion	Jiang <i>et al.</i> , 2004
	<i>amyloid precursor protein (APP)</i>	exon 7	exclusion	Jiang <i>et al.</i> , 2004

Tableau 5: Liste des gènes dont l'épissage est altéré dans la DM1

1.4.2.2.1. Myotonie et défaut d'épissage alternatif du canal chlore ClC-1

La myotonie se définit par une contraction musculaire indûment prolongée et initiée par une commande volontaire, une percussion directe du muscle ou une stimulation électrique de son nerf moteur. Elle reflète un état d'hyperexcitabilité des fibres musculaires qui résulte d'un dysfonctionnement de la conductance des ions chlorure ou sodium suite à une expression anormale de ces deux types de canaux dans les muscles squelettiques. Les myotonies non dystrophiques se distinguent des dystrophies myotoniques car elles portent des mutations sur les gènes *ClC-1*, codant les canaux chlore, ou *SCNA4*, codant les canaux sodium (Figure 14) (Mankodi, 2008).

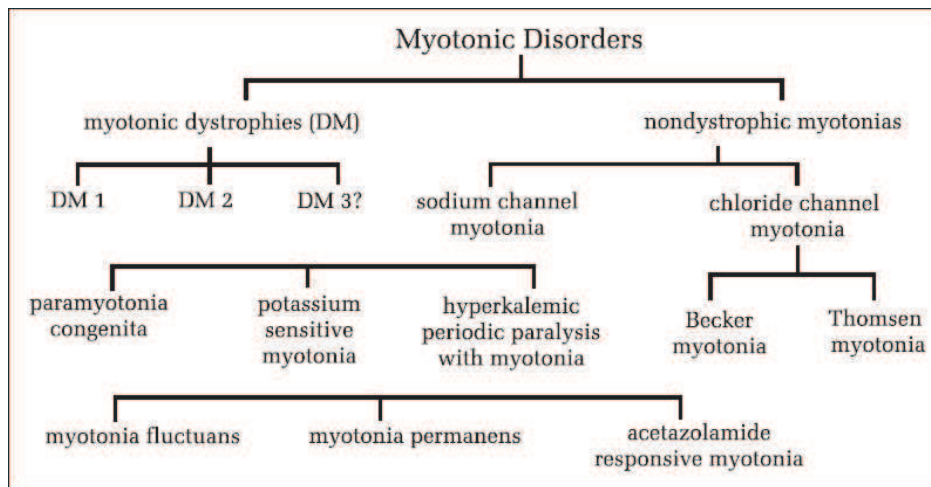


Figure 14 : Hiérarchisation des différents types de myotonies.

Dans la DM1, la conductance transmembranaire du chlore est altérée du fait de la perte de fonctionnalité de la protéine ClC-1, causée par l'altération de l'épissage alternatif de son pré-ARNm (Mankodi *et al.*, 2002). Une réduction d'expression de 10% de la protéine ClC-1 par rapport à la normale est en effet suffisante pour engendrer les symptômes myotoniques chez des individus DM1. Cette diminution d'expression de ClC-1 a pu être directement corrélée à la perte de fonction de MBNL1 qui est responsable à elle seule de l'expression inappropriée de l'isoforme fœtale dans le muscle adulte. Cette isoforme embryonnaire, résultant de la non-excision des exons 2 et 7a, qui introduisent prématurément l'apparition d'un codon stop par modification du cadre de lecture normal de la protéine, est dégradée (Figure 15) (Charlet *et al.*, 2002; Lehmann-Horn et Jurkat-Rott, 1999; Lueck *et al.*, 2007). Toutefois, il n'a pas encore été démontré si ce processus de dégradation résultait du mécanisme de dégradation spécifique des ARNm non-sens (Charlet *et al.*, 2002), ou d'une perte de stabilité de l'ARNm.

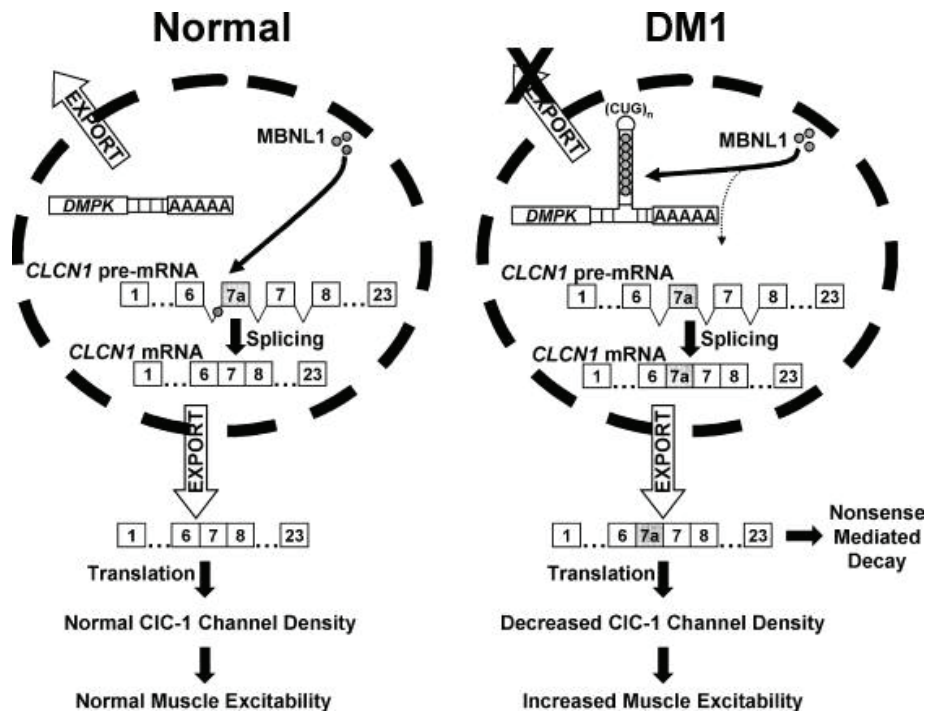


Figure 15 : Possible mécanisme moléculaire expliquant l'augmentation d'excitabilité musculaire dans DM1. (Panel de gauche) L'épissage alternatif de *CICN1* est régulé par MBNL1, qui se fixe au niveau de sites introniques répresseurs au niveau de l'intron 6. (Panel de droite) La déplétion en MBNL1 résulte dans l'inclusion anormale d'exons (tels que l'exon 7a) introduisant des codons stop de façon prématurée. Ces transcrits anormalement épissés sont exportés dans le cytoplasme où ils sont dégradés par NMD (pour « nonsense-mediated decay ») et/ou traduits en protéines tronquées pouvant avoir des effets dominant-négatifs (Lueck *et al.*, 2007)

La relation directe entre la perte de fonction de MBNL1, l'altération de l'épissage alternatif de *CIC-1* et la survenue de la myotonie, a essentiellement été établie par deux études utilisant des modèles murins.

La première étude, basée sur la surexpression de MBNL1 par le biais d'adeno-associated virus (AAV) dans les muscles squelettiques de souris présentant les symptômes de la DM1 (HSA^{LR}), démontre que la séquestration de MBNL1 au niveau des *foci* est bien responsable de l'hyperexcitabilité musculaire enregistrée. En effet, la seule augmentation d'un facteur 2 du niveau de MBNL1 dans les noyaux des cellules musculaires après transduction est suffisante pour rétablir le profil d'épissage adulte de *Clc-1*, *Cypher*, *Serca1* et *Tnnt3*, et d'éliminer la myotonie pendant 23 semaines (Kanadia *et al.*, 2006).

La deuxième étude montre que l'injection d'oligonucléotides antisens (AON) ciblant les sites d'épissage de *CIC-1* dans deux types de souris DM1 est capable de réprimer l'inclusion de l'exon 7a et de restaurer ainsi le cadre de lecture et le bon niveau d'expression de la protéine fonctionnelle. Ceci aboutit à la restauration de l'intensité des courants CIC-1 et à une nette réduction de la myotonie

observée chez ces animaux (Wheeler *et al.*, 2007). Par la mise en évidence de la fixation de CUGBP1 aux pré-ARNm de *CIC-1*, des études avaient également suggéré que CUGBP1 pouvait être un bon candidat pour contribuer au défaut d'épissage de *CIC-1* menant à la myotonie (Charlet *et al.*, 2002).

1.4.2.2.2. Résistance à l'insuline et défaut d'épissage alternatif du récepteur à l'insuline

Différentes études ont suggéré l'association de la DM1 à des syndrômes métaboliques, concordant avec un risque multiplié par 4 de développer un diabète de type 2 chez des patients DM1 (Caughey et Saucier, 1962). Des études cliniques ont également montré la présence d'une intolérance au glucose et d'un hyperinsulinisme résultant d'une résistance à l'insuline (Moxley *et al.*, 1984), d'une augmentation de la masse grasseuse (Kunze et Olthoff, 1970), et d'une dyslipidémie (Wakamatsu *et al.*, 1972).

Ce phénomène de résistance à l'insuline pourrait être relié à l'anomalie de régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm du récepteur à l'insuline (*IR*) dans les muscles squelettiques. Chez une personne non atteinte, deux isoformes, tissus spécifiques, sont produites à partir de l'épissage alternatif de ce gène. Ces deux isoformes diffèrent par l'inclusion ou non de l'exon 11 composé de 36 nucléotides (Moller *et al.*, 1989; Seino et Bell, 1989). L'IR-B, l'isoforme incluant l'exon 11, est principalement exprimée au niveau des tissus responsables de l'homéostasie du glucose tels que le foie, les tissus adipeux ou les muscles squelettiques et présente une forte activité à l'insuline. En revanche, l'isoforme non musculaire, l'IR-A (absence de l'exon 11), présente deux fois plus d'affinité pour l'insuline, un temps d'internalisation et de recyclage plus rapide que l'IR-B (McClain, 1991; Mosthaf *et al.*, 1990; Vogt *et al.*, 1991), mais possède une plus faible activité (Kellerer *et al.*, 1992). Du fait de l'altération de la régulation de l'épissage alternatif de l'*IR* dans la DM1, l'exclusion de l'exon 11 est favorisée et l'isoforme IR-A se retrouve majoritairement exprimée dans les muscles squelettiques adultes (Figure 16). La prédominance de cette isoforme dans ces tissus, ou dans des cultures primaires de muscles DM1 (Savkur *et al.*, 2001) pourrait être à l'origine de la résistance à l'insuline.

Dans un premier temps, il avait été montré que ce défaut de profil d'épissage de l'*IR* était la conséquence directe de l'augmentation nucléaire de CUGBP1. L'exclusion de l'exon 11 dépendrait, en effet, de la fixation de CUGBP1 à une séquence intronique de 110 nucléotides située en amont de l'exon 11. Ce défaut avait ainsi été retrouvé dans des cellules NIH3T3 normales dans lesquelles CUGBP1 avait été surexprimée (Savkur *et al.*, 2001). Toutefois d'autres facteurs régulateurs de l'épissage, comme d'autres protéines CELF (CUG-binding protein and embryonic lethal abnormal vision-type RNA-binding protein 3-like factors) telles qu'ETR3, ont été décrits comme pouvant

également réguler l'épissage de l'*IR* (Ladd *et al.*, 2001). Une étude plus récente montre que cette régulation d'épissage de l'*IR* est beaucoup plus complexe et qu'elle implique plusieurs facteurs régulateurs de l'épissage, tels que la protéine hnRNP H qui est surexprimée dans le noyau des cellules DM1 et qui privilégierait l'excision de l'exon 11. Cet évènement serait potentialisé par le complexe qui se formerait entre hnRNP H et CUGBP1 alors qu'à l'inverse, il serait réduit par l'action antagoniste de MBNL1. La surexpression de MBNL1, associée à une diminution d'expression de CUGBP1 et hnRNP H par siRNA, est à l'heure actuelle la meilleure approche *in vitro* pour rétablir partiellement le profil normal d'épissage de l'*IR* (Paul *et al.*, 2006).

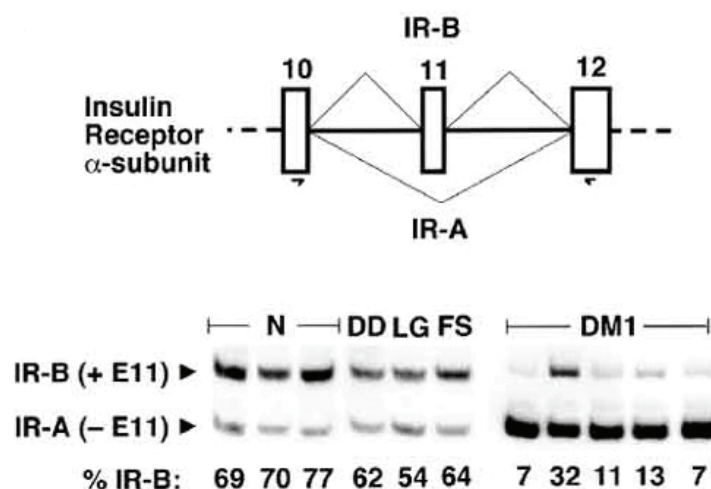


Figure 16 : Illustration du défaut d'épissage de gène codant pour récepteur à l'insuline au niveau de biopsies musculaires. N : biopsie musculaire de patients non atteints, DD : maladie de Duchenne, LG : DM2, FS : FSHD, DM1 (Savkur *et al.*, 2001).

En conclusion, ces premières études mécanistiques ont ainsi permis de montrer que MBNL1 et CUGBP1 agissaient de façon antagoniste dans la régulation de certains épissages alternatifs. L'inactivation de MBNL1 ou la surexpression de CUGBP1 aboutit dans de nombreux cas au même défaut d'épissage, comme cela a été démontré pour l'*IR* ou *TNNT3* (Dansithong *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2004; Kanadia *et al.*, 2003). En conclusion, l'altération de ces deux activités protéiques, qui agissent de manière antagoniste et dont les quantités nucléaires dans la DM1 sont inversées par rapport à celles retrouvées au cours du développement normal (Kalsotra *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006), est responsable des nombreuses anomalies d'épissage qui conduisent à l'expression d'isoformes fœtales dans des tissus adultes.

1.4.2.2.3. Atteinte du système nerveux central et défauts d'épissage alternatif liés à la DM1

Les nombreuses études qui se sont principalement focalisées sur la relation entre les conséquences moléculaires des répétitions CTG comme la présence des *foci*, et l'aspect multisystémique de la maladie, ont contribué au fait que la DM1 a longtemps été considérée comme une maladie restreinte à des défauts d'épissage alternatif. Néanmoins, de nombreux signes cliniques comme ceux relatés précédemment dans le SNC ne sont pas reliés à des défauts d'épissage et supposent donc que les mécanismes moléculaires impliqués dans la DM1 sont encore plus complexes.

1.4.3. Effet trans-dominant des CTG sur l'expression des gènes

Des modifications dans le niveau d'expression de gènes ont été rapportées chez des patients atteints de la DM1 ainsi que dans plusieurs modèles transgéniques de la pathologie (Botta *et al.*, 2007; Ebralidze *et al.*, 2004; Osborne *et al.*, 2009). Ces modifications peuvent être la conséquence d'altérations dans la disponibilité de facteurs de transcription due à leur séquestration par les CUG (Ebralidze *et al.*, 2004). En effet, certains facteurs de transcription tels que SP1, RARG, STAT1 ou encore STAT3 ont été décrits comme pouvant se lier aux répétitions CUG. Leur séquestration affecterait par conséquent l'expression de leurs nombreuses cibles (Figure 17) (Ebralidze *et al.*, 2004). Par exemple, ce mécanisme pourrait être responsable de l'altération de l'expression du facteur de transcription NKX2.5 au niveau du cœur de souris transgéniques DM1 (Yadava *et al.*, 2008).

Comme décrit précédemment, la protéine CUGBP1 peut également contribuer à ces modifications d'expression. De part ses fonctions aussi bien dans l'épissage que dans la traduction, la déadénylation et la dégradation des ARNs, l'altération de l'expression de CUGBP1 dans la DM1 entraînerait une modification de l'expression de p21 et du TNF (Figure 17) (Iakova *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2003; Paillard *et al.*, 2003; Timchenko *et al.*, 1999; Vlasova et Bohjanen, 2008).

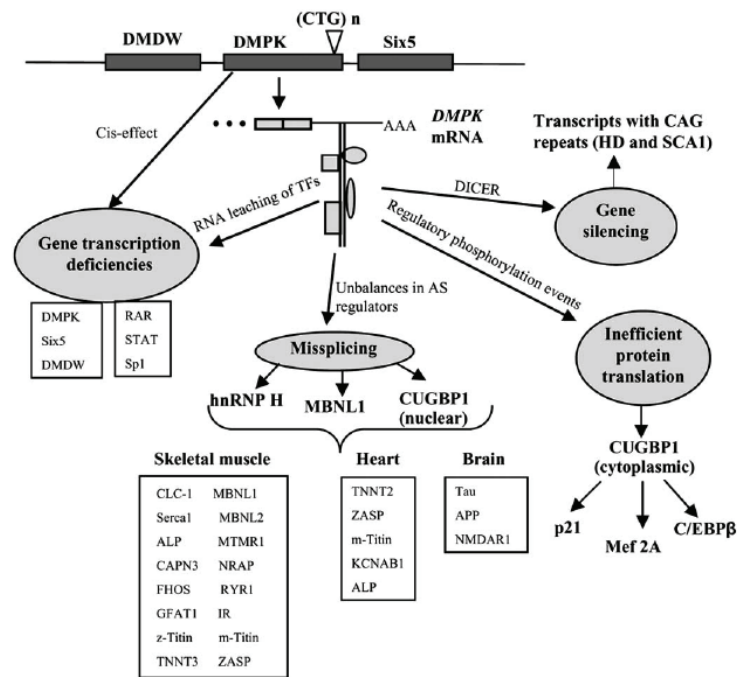


Figure 17 : Multiples effets des répétitions CTG sur la régulation de l'expression des gènes. Les répétitions CTG peuvent induire localement une diminution de la transcription des gènes *Six5* et *DMDW* ; séquestrer divers facteurs de transcription ; altérer l'épissage alternatif en dérégulant les activités des protéines MBNL1, CUGBP1 ou hnRNP H ; perturber la régulation de la phosphorylation (Llamusi et Artero, 2008)

De même, Krol et ses collaborateurs ont proposé que les expansions de CUG étaient clivées par la ribonucléase Dicer pour produire plusieurs fragments de CUG qui viendraient alors inhiber l'expression par le principe d'ARN interférence (Krol *et al.*, 2007).

Récemment, deux études ont identifié un certain nombre de modifications d'expression génique dans deux modèles transgéniques murins de la DM1. Le premier modèle exprimait des expansions de triplets au sein du gène de l'actine (modèle HSA^{LR}) alors que le second était un autre KO pour le gène *Mbnl1* (*Mbnl1* ^{-/-}) (Du *et al.*; Osborne *et al.*, 2009). Les auteurs montrent que ces deux modèles, qui récapitulent plusieurs phénotypes de la maladie, présentent des similitudes dans les modifications d'expression. Si ces résultats témoignent de l'importance de la perte de fonction de Mbnl1 dans l'effet *trans*-dominant des CTG sur l'expression, ils montrent également que la perte de Mbnl1 peut induire à elle seule, des modifications d'expression génique. Ceci souligne la complexité du problème et la part d'inconnu qui l'entoure. A ce jour, aucune fonction de Mbnl1 dans la régulation d'expression des gènes n'a été décrite. Par ailleurs, cet effet *trans*-dominant sur l'expression de gènes est également observé dans la DM2 où l'on constate des modifications similaires à celles retrouvées dans la DM1 (Botta *et al.*, 2007). Cet effet participe probablement à la similitude clinique entre les deux pathologies.

Presque vingt ans après la découverte de la mutation causale de la DM1, les nombreux travaux de recherche ont permis de caractériser la complexité du développement de cette pathologie multisystémique en identifiant ses mécanismes moléculaires. Bien que certains de ces mécanismes ne soient pas totalement maîtrisés, les principes de leur mode d'action sont à la base des différentes stratégies thérapeutiques qui ont été développées.

1.5. Approches thérapeutiques

A ce jour, il n'existe aucun traitement permettant d'éliminer l'ensemble des signes cliniques de la DM1. Seuls certains composés se sont révélés efficaces pour réduire le degré d'atteinte de quelques symptômes comme l'hypersomnolence ou la myotonie. En se basant sur les mécanismes moléculaires décrits ci-dessus, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été envisagées. Celles-ci se répartissent selon qu'elles ciblent : 1. l'expansion de la mutation au niveau de l'ADN ; 2. les transcrits mutés en les dégradant ou en libérant les protéines fixées aux répétitions ; 3. la normalisation de l'activité des protéines CUGBP1/MBNL1 ; 4. la correction des défauts d'épissage associés à l'expression de la mutation. (Figure 18). La première approche ne sera pas abordée par la suite dans la mesure où aucune donnée expérimentale n'existe quant au potentiel thérapeutique de cette approche.

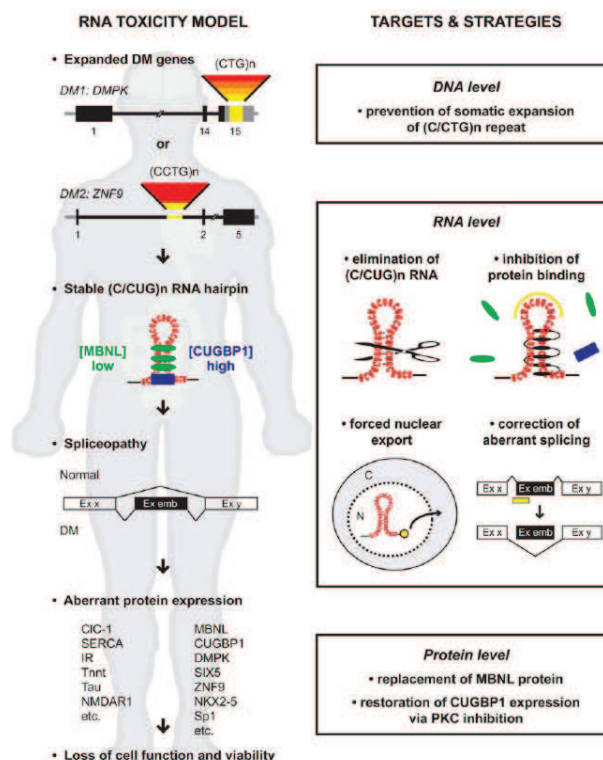


Figure 18 : Illustration du processus pathologique des extensions génomiques et des différentes cibles moléculaires thérapeutiques applicables dans les dystrophies myotoniques (Mulders *et al.*).

1.5.1. Cibler les ARNm DMPK mutés

1.5.1.1. Approche d'extinction de l'ARNm DMPK muté

Pour cette stratégie, deux options ont été envisagées : dégrader l'ensemble des transcrits DMPK ou éliminer sélectivement les transcrits mutés. Dans ce dernier cas, mise à part la longueur des répétitions CTG, aucun polymorphisme n'a été décrit permettant de discriminer les transcrits DMPK mutés des normaux. L'option de dégradation de l'ensemble des transcrits DMPK peut quant à elle entraîner des effets secondaires dus à l'élimination complète de l'expression de la DMPK. Comme décrit précédemment, les souris *Dmpk*^{-/-} présentent un phénotype modéré et les patients homozygotes pour la mutation DMPK ne présentent pas de symptômes sévères. Ainsi il peut être postulé qu'une quantité limitée de DMPK doit être suffisante pour maintenir l'intégrité fonctionnelle des mécanismes mis en jeu par les cellules. Dans le but de dégrader l'ARNm porteur des répétitions CUG à l'origine du processus pathologique, plusieurs approches basées sur des stratégies moléculaires anti-sens ont ainsi été développées (Figure 19).

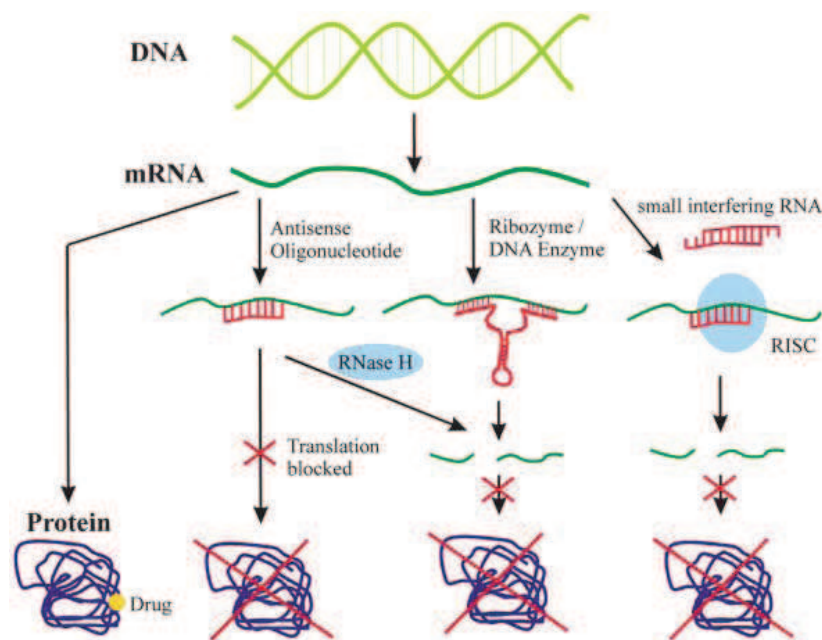


Figure 19 : Différents outils d'inhibition génique au niveau post-transcriptionnel ciblant l'ARNm (Kurreck, 2003).

Depuis environ cinq ans, un certain nombre d'approches moléculaires visant à dégrader les transcrits mutés ont été développées (Tableau 6). Ces études concordent pour démontrer les perspectives prometteuses de cette approche, même si plusieurs problèmes restent à élucider. Par exemple, l'un des grands challenges consiste à développer des systèmes permettant de délivrer efficacement ces molécules anti-sens *in vivo*.

Equipe	Stratégie	Modèle(s)	Résultats	Références
Puymirat	ARN antisens de 149 pb complémentaire de (CUG)13 et de la région de 110 pb adjacente	rétrovirus dans myoblastes de patient	- diminution de 80 et 50% de l'ARNm muté et non muté - restauration de la fusion des myoblastes et de la capture du glucose - normalisation de la quantité de CUGBP1	Furling <i>et al.</i> , 2003
Puymirat	"hammerhead" ribozymes nucléaires	myoblastes de patient	- diminution de 63 et 50% de l'ARNm muté et non muté - diminution du nombre de <i>foci</i> - amélioration de l'épissage de l' <i>INSR</i>	Langlois <i>et al.</i> , 2003
Puymirat	shARN ciblant la DMPK	lentivirus dans myoblastes de patient (3200 répétitions)	diminution d'environ 50% de l'ARNm muté nucléaire et d'au moins 70% de l'ARNm non muté nucléaire et cytoplasmique respectivement	Langlois <i>et al.</i> , 2005
Krzyzosiak	siRNA (CAG)7	fibroblastes de patients	réduction marquée de la quantité d'ARNm muté avec très peu d'effet sur l'allèle non muté	Krol <i>et al.</i> , 2007
Thornton	siRNA ciblant (CUG) _n	injection intramusculaire dans souris HSALR	- diminution de 70-80% de l'ARNm muté - très peu d'effet sur transcrit portant CUG non répétés - diminution marquée <i>foci</i> nucléaires (nombre et intensité) et diminution séquestration MBNL1 - amélioration épissages : <i>INSR</i> , <i>cTNT</i> , <i>CLCN1</i> - amélioration myotonie	Sobczak <i>et al.</i> , 2009
Wansink	AONs (antisens oligonucleotides)	- screening dans modèles myoblastes/myotubes de souris (500 CTG) et patients - validation dans modèles souris DM500 (Gourdon G) et HSALR	- identification 2 -O-methyl-phosphorothioatemoifid (CAG)7 AON - extinction ARNm muté (90% <i>in vitro</i> , 30 à 80% <i>in vivo</i>) - diminution <i>foci</i> - souris : administration musculaire : diminution ARNm muté et amélioration d'épissages (<i>Serca1</i> , <i>Mbnl1</i> , <i>Ttn</i> , <i>Clcn1</i> , <i>Tnnt3</i>) - en cours : optimisation en faisant varier tailles et modifications chimiques au niveau AONs	Mulders <i>et al.</i> , 2009a; Mulders <i>et al.</i> , 2009b
Furling	antisens au sein d'un gène sU7-snRNA	transduction lentivirus dans myoblastes de patient	- diminution de 70-80% ARNm muté - diminution du nombre de cellules ayant des <i>foci</i> et libération de MBNL1 - correction de défauts d'épissages dans les myotubes - restauration de la différenciation myogénique	François <i>et al.</i> , 2009

Tableau 6 : Stratégies anti-sens utilisées dans le but de dégrader l'ARNm DMPK muté (Laustriat, 2010).

1.5.1.2. Inhiber la fixation des protéines de liaison à l'ARN muté

En 2009, plusieurs études décrivant différentes stratégies basées soit sur des oligonucléotides anti-sens, soit sur des petites molécules permettant de diminuer, avec une certaine efficacité, la liaison de MBNL1 aux répétitions, ont été publiées (Tableau 7). Dans la mesure où seulement 50% du niveau

d'expression normal de MBNL1 est suffisant pour assurer correctement son rôle régulateur de l'épissage alternatif chez la souris (Kanadia *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2006), ces approches apparaissent très prometteuses.

Equipe	Stratégie	Modèle(s)	Résultats	Références
Thornton	AONs morpholinos de 25 nucléotides "CAG25" (morpholino : pas de clivage de l'ARN cible)	injection intramusculaire et électroporation dans souris HSALR	- réduction <i>foci</i> nucléaires et libération MBNL1 - correction d'anomalies d'épissages associées à la perte de fonction de MBNL1 (<i>Clcn1</i> , <i>Serca1</i> , <i>m-Ttn</i> , <i>Zasp</i>) et persistance de l'effet 14 semaines après injection - restauration de la myotonie	Wheeler <i>et al.</i> , 2009
Berglund	petites molécules	- modèle cellulaire : lignée Hela - modèle souris HSALR	- identification pentamidine et néomycine B permettant de diminuer la liaison de MBNL1 aux motifs CUG <i>in vitro</i> - pentamidine : amélioration d'anomalies d'épissages associées à MBNL1 (<i>INSR</i> et <i>cTNT</i> <i>via</i> minigènes) et diminution des docis et donc de la séquestration de MBNL1 - restauration partielle épissages <i>in vivo</i> (<i>Clcn1</i> et <i>Serca1</i>) mais impossibilité d'augmenter davantage les doses administrées sinon toxicité - en cours : résultats intéressants avec heptamidine	Warf <i>et al.</i> , 2009b; Warf <i>et al.</i> , 2009c
Zimmerman	petites molécules	/	- mise au point rationnelle d'un Ligand "1" pour sa capacité à se fixer aux répétitions CUG - Ligand 1 déstabilise les complexes formés de MBNL1 et des (CUG) ₄ et (CUG) ₁₂	Arambula <i>et al.</i> , 2009
Miller	petites molécules	/	- criblage de 11325 composés résultant de synthèse combinatoire pour leur capacité à se fixer de manière sélective aux motifs (CUG) _n - identification de composés qui peuvent, de plus, interférer avec la liaison de MBNL1 aux répétitions	Gareiss <i>et al.</i> , 2008
Disney	petites molécules	/	rational design de ligands pour leur capacité à se fixer de manière sélective aux motifs (CUG) _n et identification de composés qui peuvent, de plus, interférer avec la liaison de MBNL1 aux répétitions	Lee <i>et al.</i> , 2009c; Pushechnikov <i>et al.</i> , 2009

Tableau 7 : Approches visant à empêcher la liaison de MBNL1 aux répétitions CUG (Laustriat, 2010).

1.5.1.3. Favoriser l'export cytoplasmique des ARNm mutés

L'idée que la promotion de l'export cytoplasmique de l'ARN muté puisse présenter des effets bénéfiques pour les cellules DM1 a tout d'abord été étudiée après introduction d'un élément régulateur WRPE (pour Woodchuck post-transcriptionnel Regulatory Element) favorisant l'export cytoplasmique, dans un transcrit artificiel comprenant 200 répétitions CUG (Mastroiannopoulos *et al.*, 2005). La présence de cet élément permet d'augmenter l'export nucléaire des transcrits mutés et améliore la différenciation des myoblastes DM1 dans lesquels cette construction a été introduite (Mulders *et al.*). L'effet bénéfique de l'expulsion cytoplasmique des ARN mutés a également été

observé par Dansithong *et al.* à l'aide d'un modèle murin de la DM1 dans lequel 400 répétitions CTG associées à MBNL1 présentes exclusivement au niveau cytoplasmique n'aboutit à aucun défaut caractéristique de la DM1 (Dansithong *et al.*, 2008). A l'heure actuelle, aucune molécule n'a été identifiée pour changer ou favoriser cet export cytoplasmique, mais leur application pourrait présenter l'avantage de restaurer le niveau d'expression de DMPK.

1.5.2. Approche de compensation de l'expression de MBNL1 et CUGBP1

1.5.2.1. Surexpression de MBNL1

Comme évoqué précédemment dans la partie MBNL1 (1.3.4.2), la présence de l'ARNm *DMPK* mutant est responsable dans la DM1, de la séquestration de MBNL1 au niveau des *foci*, conduisant à la perte de fonction MBNL1, à de multiples défauts d'épissage et d'expression de gènes. Une compensation de sa fonction par une augmentation de son expression dans les tissus atteints, a donc été envisagée. En effet, une fois ses sites de fixation à l'ARNm *DMPK* saturés, l'excès de MBNL1 peut agir normalement au niveau de ses cibles habituelles. Cette stratégie a été réalisée dans des souris transgéniques HSA^{LR} par injection intramusculaire d'un AAV surexprimant MBNL1 (Kanadia *et al.*, 2006). Bien que pour les auteurs de cette étude, la surexpression induite soit insuffisante pour saturer l'ensemble des sites de fixation de MBNL1 au niveau des répétitions CUG de l'ARN double brin, le niveau d'expression nucléaire de la protéine est doublé dans les muscles squelettiques. Cette surexpression s'avère suffisante pour réduire les signes myotoniques et corriger les profils d'épissage des gènes *CIC-1*, *CYPHER*, *SERCA1* et *TNNT3* pendant plus de 23 semaines.

Ces améliorations ayant également été observées au niveau musculaire chez la drosophile (de Haro *et al.*, 2006), l'augmentation de MBNL1 semblerait être une base intéressante pour d'éventuelles stratégies thérapeutiques chez les patients DM1. En revanche, l'injection locale d'AAV est restreinte aux tissus musculaires et n'offre pas d'application clinique à long terme. Il est donc important d'adapter cette approche à un mode d'administration systémique d'autant plus que cette approche ne modifie en rien les altérations dues aux modifications d'expression de CUGBP1.

1.5.2.2. Réduction de l'activité de CUGBP1

Comme vu en (1.3.4.1) dans le paragraphe consacré à CUGBP1, l'augmentation de l'activité de CUGBP1 dans les muscles squelettiques et cardiaques est l'une des caractéristiques moléculaires de la DM1 (Dansithong *et al.*, 2005; Savkur *et al.*, 2001; Timchenko *et al.*, 2001a). Que ce soit en surexprimant spécifiquement CUGBP1 dans les muscles squelettiques de souris (Timchenko *et al.*, 2004), ou en induisant une augmentation du nombre de répétitions dans les muscles squelettiques (Orengo *et al.*, 2008) ou cardiaques (Wang *et al.*, 2007), les différents modèles *in vivo* ont montré que

l'élévation de CUGBP1 contribuait à la dégénérescence musculaire observée dans la DM1 (Timchenko *et al.*, 2004), et était responsable au niveau moléculaire d'anomalies d'épissage spécifiques de CUGBP1 puisque les défauts de profil des gènes *Ank2*, *Capzb* ou *Fxr1*, sont indépendants de la séquestration de MBNL1 (Orengo *et al.*, 2008). Ces défauts d'épissage apparaissent rapidement puisqu'ils sont détectés une douzaine d'heures après la formation des *foci*, qui précède la séquestration de MBNL1 et l'accumulation nucléaire de CUGBP1 (Wang *et al.*, 2007).

La relation directe entre l'activité anormalement élevée de la PKC, censée diminuer au cours du développement cardiaque (Hamplova *et al.*, 2005; Schreiber *et al.*, 2001), et l'état hyperphosphorylé, plus stable de CUGBP1 (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007), a permis d'envisager une piste thérapeutique qui empêcherait l'augmentation de CUGBP1 en inhibant la PKC en amont. En effet, l'injection d'un inhibiteur spécifique de la PKC, le Ro-31-8220, dans des modèles de souris DM1 possédant 960 répétitions, permet de diminuer l'expression de CUGBP1 au niveau cardiaque et d'améliorer ainsi la conduction cardiaque, les défauts de contraction et les défauts d'épissage contrôlés par CUGBP1 (Wang *et al.*, 2009).

1.5.3. Approches symptomatologiques

Comme mentionné en introduction de ce chapitre, différents traitements, majoritairement pharmacologiques, sont développés afin de cibler de façon spécifique certains symptômes de la DM1. Ainsi, plusieurs composés ont fait l'objet d'évaluation lors d'études précliniques ou cliniques. Parmi eux figurent la mexilétine, un antiarrhythmique qui a été utilisé pour traiter la myotonie (Martens *et al.*, 2005), la taurine et quelques antidépresseurs tricycliques tels que la clomipramine et l'imipramine, pour lutter contre les faiblesses musculaires (Trip *et al.*, 2006). Mise à part les résultats récents de deux essais réalisés en double aveugle sur 20 patients DM1 qui ont montré l'efficacité de la mexilétine (150 et 200mg) sur la diminution du temps de relaxation après contraction des muscles de la main (Logigian *et al.*, 2010), les résultats des autres essais restent décevants. En effet, les conclusions apportées par la revue Cochrane de 2006 ne montrent pas que ces molécules soient réellement efficaces sur les 113 patients DM1 testés, ce qui concorde avec les résultats d'autres études qui ont administré de la déhydroépiandrostérone (DHEA), de la testostérone (NCT00167609, <http://www.clinicaltrials.gov>), de la créatine ou encore des inhibiteurs de la myostatine pour augmenter la force musculaire des patients DM1 (Griggs *et al.*, 1990; Tarnopolsky *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2008). De même, l'efficacité de psychostimulants comme le Modafinil®, utilisé pour améliorer les troubles de la vigilance ou les troubles du sommeil, n'a pas été clairement démontrée dans le cadre de la DM1 (Orlikowski *et al.*, 2009). Des études ont également porté sur le facteur de croissance à l'insuline 1 (IGF1) puisque une diminution de cette hormone stimulant l'anabolisme musculaire pourrait contribuer à la faiblesse et à l'atrophie musculaire (Wheeler, 2008). L'injection

d'IGF1 recombinante humaine (rhIGF-1) à des patients DM1 semblait améliorer la force ainsi que certaines fonctions musculaires, mais son association à la rhIGFBP3 (*recombinant human IGF binding protein 3*) en vue de pallier sa faible demi-vie (Vlachopapadopoulou *et al.*, 1995), n'a pas montré d'effet significatif sur l'endurance ou la force musculaire des patients au cours d'un essai de phase II comprenant 69 patients DM1 (<http://investor.insmed.com/>).

L'ensemble de ces données illustrent les énormes progrès réalisés ces dernières années dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la DM1 mais recense aussi les limites de ces stratégies. Comme cela a déjà été mentionné précédemment, l'un des principaux problèmes rencontré porte sur la difficulté à administrer efficacement les différents traitements. Le caractère multisystémique de la DM1 constitue également un second obstacle majeur pour la mise en place de traitements puisque la variabilité des symptômes et des tissus affectés rend difficile le choix de la cible à traiter ainsi que l'identification de biomarqueurs significatifs pour des essais cliniques. Finalement, le développement de nouveaux modèles de la pathologie plus sophistiqués peut également permettre d'affiner ces différentes pistes thérapeutiques. L'isolement ou la miniaturisation de systèmes complexes offre également l'opportunité de réaliser des expérimentations pour mieux disséquer et interpréter chaque étape d'un processus biologique.

2. Modélisation pathologique de la DM1

Comme nous l'avons vu précédemment, le développement de modèles pathologiques mimant de la meilleure façon possible les effets observés chez les patients atteints par une maladie génétique est une étape délicate mais cependant indispensable pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques. Toutefois, il est important de considérer plusieurs paramètres variables qui résultent de l'hétérogénéité de la population humaine. En effet, les symptômes pathologiques peuvent se présenter sous différentes formes dans un groupe d'individus ou au sein même d'un individu selon son âge, son sexe, sa physiologie, son fond génétique ou encore son mode de vie.

Outre leurs applications mécanistiques, ces modèles peuvent également servir à identifier des nouveaux biomarqueurs associés à la pathologie. La définition d'un biomarqueur a été « officiellement » précisée par un groupe de travail américain du « National Institutes of Health » : un biomarqueur est un indicateur qualitatif d'un processus biologique ou pathologique défini, qui peut être utilisé à titre diagnostique ou pour piloter des essais thérapeutiques (2001). Ces biomarqueurs peuvent être d'ordre protéomique, génomique ou métabolique (Bowser *et al.*, 2006; Ganesalingam et Bowser).

La survenue d'une maladie résulte généralement d'une combinaison de plusieurs facteurs, présents à un instant précis et dans des circonstances déterminées. Il peut s'agir de facteurs génétiques tels que des mutations, des facteurs extrinsèques comme des agents infectieux, parasitaires, toxiques ou autres événements stressants extérieurs, ou encore de la combinaison de plusieurs de ces facteurs. Il est donc possible de définir une pathologie comme une anomalie mécanistique qui entraîne un déficit fonctionnel. Celui-ci est responsable d'un dysfonctionnement cellulaire qui se répercute généralement au niveau du tissu et de l'organe. Les symptômes correspondent quant à eux à la manifestation de ce dysfonctionnement à l'échelle de l'organisme entier. Selon que l'étude porte sur un mécanisme d'action, une fonction biologique ou plus globalement sur la physiologie, différents modèles sont utilisés (Sams-Dodd, 2006a). Dans tous les cas de création de modèle pathologique, il est nécessaire de disposer d'un modèle équivalent sain afin de pouvoir réaliser une étude comparative. De plus, dans les cas de modélisation pathologique *in vitro*, le modèle doit reproduire le plus fidèlement possible les dysfonctionnements observés *in vivo*, et rester fonctionnel (Cooper *et al.*, 2009). Toutefois, selon que les paramètres étudiés se situent au niveau physiologique, d'une fonction biologique ou d'un mécanisme d'action, l'approche de modélisation est différente.

2.1. Choix de l'approche

Le choix de l'approche dépend des caractéristiques de la pathologie étudiée et du type de stratégie thérapeutique que l'on souhaite développer en aval. Pour cela, Sams-Dodd propose différentes composantes du modèle de pathologie calquée sur celles utilisées pour décrire la maladie (Sams-Dodd, 2006b) (Figure 20).

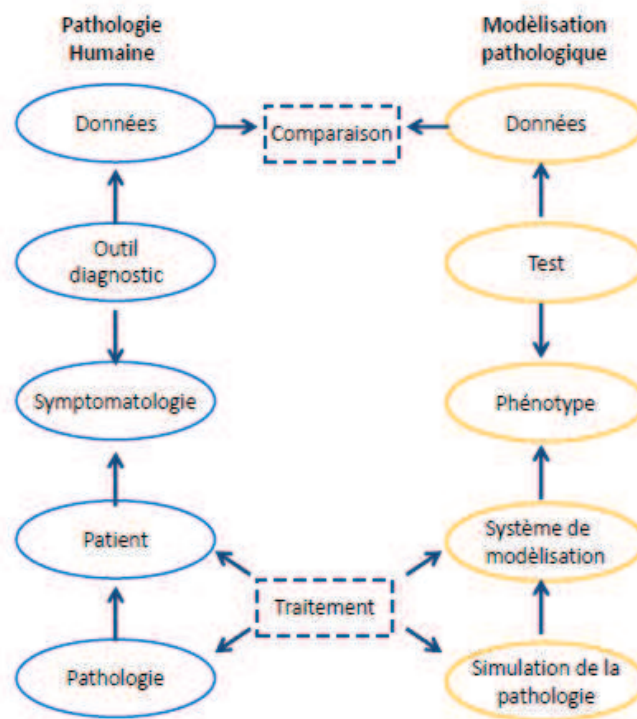


Figure 20: Représentation en parallèle des caractéristiques d'une pathologie chez le patient et dans le modèle d'étude (Sams-Dodd, 2006b).

Lors de la modélisation d'une pathologie, le système d'étude est l'équivalent du patient. Si ce système ne porte pas de manière intrinsèque les causes de la maladie étudiée, il convient de les simuler. Cette simulation est à l'origine du phénotype. Les caractéristiques de ce phénotype doivent pouvoir être étudiées à l'aide de tests permettant de discriminer le normal de l'anormal. Ces tests sont l'équivalent des outils de diagnostic utilisé en clinique. Pour valider le modèle, les données générées par le système modèle doivent pouvoir être comparées à celles du patient.

2.1.1. Approche basée sur un mécanisme d'action

Généralement effectué *in vitro* sur des systèmes cellulaires ou acellulaires, l'approche basée sur un mécanisme d'action est intéressante pour déterminer rapidement si la perturbation d'un élément du système peut être à l'origine d'une modification phénotypique, comme dans le cadre de recherche de ligand. Toutefois, les résultats obtenus à partir de ces modèles de faible complexité doivent être validés par une approche fonctionnelle ou physiologique puisque cette approche ne reflète pas la complexité et la diversité de la mise en place d'une pathologie

2.1.2. Approche fonctionnelle

L'intérêt majeur de cette approche est de mesurer directement *in vitro* l'efficacité biologique d'un composé tout en observant ses effets sur le phénotype. Ainsi, les premières validations de molécules à potentiel thérapeutique ou les stratégies de surexpression et d'inactivation génique sont des approches fonctionnelles qui peuvent être associées à une meilleure compréhension mécanistique ou à un processus pathologique (guidance axonale, dégénération cellulaire,...). Des études comparatives entre des modèles pathologiques et leurs équivalents sains permettent par exemple d'associer une fonction à des gènes préalablement identifiés lors d'approches transcriptomiques différentielles, sans aucune restriction du nombre de tissus cellulaires et en tenant compte des systèmes de régulation.

2.1.3. Approche physiologique

L'approche basée sur la physiologie est plus appropriée pour étudier les pathologies dont le phénotype n'est visible qu'à l'échelle de l'organisme comme les troubles du comportement ou l'hypertension artérielle (Lindsay, 2003). Cette vue s'étendant à l'organisme dans son intégralité, il devient plus probable de développer des médicaments interférant avec le mécanisme causal de la pathologie. Néanmoins, pour des raisons évidentes, le modèle ne peut être d'origine humaine et entraîne des restrictions d'analyse liées au changement d'espèce. Par conséquent, la pathologie modélisée chez ce dernier doit principalement être axée sur la reproduction des symptômes.

L'ensemble des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la DM1 et présentés dans la partie précédente a résulté de la mise en place de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo*. Dans un premier temps, certains modèles ont servi à mieux comprendre les processus de mise en place de la pathologie, alors que par la suite, d'autres ont été créés afin de valider le dysfonctionnement de certaines protéines.

2.2. Modèles pathologiques de la DM1

2.2.1. Modèles animaux de la DM1

Dans la DM1, les modèles animaux ont essentiellement été développés chez la souris même si certaines études ont été effectuées chez la drosophile ou le poisson-zèbre (zebrafish). Ils ont aussi bien permis d'étudier l'instabilité de l'ADN, les répercussions cellulaires dues à la présence des répétitions CTG dont les défauts d'épissage, ainsi que le rôle de différents acteurs moléculaires par le biais de leur extinction (Wansink et Wieringa, 2003).

Le modèle ayant beaucoup apporté à la compréhension du mécanisme pathologique de la DM1 est celui des souris HSA^{LR} qui portent près de 250 répétitions CTG au niveau du dernier exon de la 3'UTR de l'alpha-actine du muscle squelettique *ACTA1* (Mankodi *et al.*, 2000). En insérant les répétitions CTG dans un autre gène que la *DMPK*, Mankodi *et al.* ont ainsi démontré que l'effet pathologique de la mutation provenait d'un gain de fonction toxique des ARNm contenant les répétitions CUG. Bien que ces souris ne manifestent aucune faiblesse musculaire, elles présentent une myotonie, ainsi que de nombreuses caractéristiques tissulaires de la DM1 comme les fibres en anneaux, une centronucléation et la formation des *foci* dans les cellules musculaires accompagnées des défauts d'épissage classiquement décrits chez des patients DM1 (Lin *et al.*, 2006; Mankodi *et al.*, 2002).

L'importance de ces répétitions CTG dans le processus pathologique de la DM1 avait toutefois été démontrée par des études antérieures, mais elles avaient toujours été insérées au niveau du gène de la *DMPK*. En effet, puisque le caractère multisystémique de la maladie ne pouvait pas être expliqué par l'altération seule du taux d'expression de la *DMPK*, deux modèles de souris contenant des répétitions CTG au niveau du gène *Dmpk* avaient été développés de manière indépendante (Gourdon *et al.*, 1997; Monckton *et al.*, 1997). Ces deux modèles diffèrent uniquement par la taille de la séquence humaine et le nombre de répétitions insérées. Dans le premier cas, l'équipe du Dr. Monckton a inséré un fragment de la région 3'UTR de la *DMPK* humaine contenant 162 répétitions alors que c'est le locus DM dans son intégralité (45 kb) avec 55 CTG et les deux gènes adjacents à la *DMPK* (*DMWD* et *SIX5*) qui a été transféré dans les souris développées par l'équipe du Dr. Gourdon. Il est intéressant de constater que ces deux études ont montré une instabilité méiotique et mitotique de ces répétitions CTG sur plusieurs générations. De plus, une étude approfondie réalisée sur les tissus des souris exprimant 55 CTG a corrélié l'augmentation du mosaïcisme et la longueur des répétitions avec l'âge des souris. Contrairement à ces modèles, seules les souris générées avec un cosmide contenant plus de 300 répétitions ont acquis un profil phénotypique pathologique similaire à celui observé chez les patients DM1, c'est-à-dire une forte instabilité des ARNs augmentant avec l'âge dans les tissus et le sperme,

l'apparition des *foci*, de la myotonie et des défauts musculaires (Seznec *et al.*, 2000). Bien que 300 répétitions soient insuffisantes pour induire les troubles neuronaux ou les axonopathies comme la démyélinisation dans ces souris transgéniques (Gantelet *et al.*, 2007), ce modèle a permis d'étudier et de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans les phénomènes d'expansion intergénérationnelle des répétitions et d'anticipation génétique puisqu'un modèle murin présentant plus de 700 CTG a été obtenu à partir de ces souris 300 CTG (Gomes-Pereira *et al.*, 2007). Ce « saut » de répétitions a été analysé et a permis de comprendre les mécanismes d'instabilité génétique associé à l'expression de la mutation, comme l'implication de MSH2 décrit précédemment.

D'autres modèles murins inductibles permettant d'induire l'expression de répétitions CTG, de taille variable, dans des tissus cibles tels que le muscle ou le cœur ont également été développés (Tableau 8 et 9) (Orengo, 2008 ; Wang, 2006, 2007 ; Yadava, 2008). Bien que moins pertinent que les modèles transgéniques classiques dans la mesure où le transgène est exprimé tardivement dans le développement, ces systèmes inductibles ont permis de mieux déchiffrer les mécanismes physiopathologiques restreints à un tissu spécifique, en particulier au niveau du tissu cardiaque et musculaire.

Gène	promoteur	Répétitions	tissu	Foci	MBNL1/Foci	Elevation de CUGBP1	Epissages	Symptômes	Ref
dmpk exon15	CMV	960 CTG discontinus	muscle (CRE)	++	+	+	Ank2, Capzb, Fxrf	→ Phénotypes DM1 sévères	Orengo et al., 2008
			Cœur (CRE)	++	+	+	Tnnt2	→ Cardiomyopathie sévère	Wang et al., 2007
dmpk5'UTR+GFP-dmpk3'UTR (CTG) _n	dmpk	200	tous les tissus (sous promoteur CMV)	++	+	+	Cln1, Tnnt3, Tnnt2	→ Atteinte sévère des muscles squelettiques et cardiaques	Mahadevan et al, 2006; Yadava et al., 2008
		5		NO	NO	NO	NO		

Tableau 8 : Modèles murins inductibles de la DM1

Tableau 9 : Modèles murins de la DM1 non inductibles

Gène	promoteur	Répétitions	tissu	Foci	MBNL1/Foci	Elevation de CUGBP1	Epissages	Symptomes	Ref
skeletal α -actin-CTG-3'UTR (HSA ^{U8})	HSA	250	muscle squelettique	++	+		Serca1, ZASP, Mbnl1, Mbnl2, z-Tin, m-Tin, Nrap, Capn3, Alp	→ Myotonie → Surexpression de Mbnl1 via AAV restaure les défauts d'épissage et la myotonie	Kanadia et al., 2006; Lin et al., 2006; Mankodi et al., 2000
DMPK (45kb cloné à partir d'un patient)-CTG-3'UTR	dmpk	300		++			tau (cerveau)	→ Anomalies histologiques muscles, myotonie Anomalies histologiques muscles, myotonie → Phénotype homozygote plus marqué que les hétérozygotes	Seznec et al., 2001
		550						→ Diminution force musculaire à 10 mois	Vignaud et al., 2010
		700 homozygotes					Insr, Clec1, Mapt, Mbnl1, Mbnl2, Grin1	→ petite taille	Gomez-Pereira et al., 2007;
		1000 à >1700 modèle DMSXL					muscle, cœur, cerveau, cervelet,	→ retard de croissance → Forte mortalité → Diminution de la force musculaire → Troubles de conduction cardiaque	Gomez-Pereira et al., 2007;
LacZ-CTG400	α -myosine heavy chain	400	cœur	++ CYTOPLASMIQUE	+	±	Non testé Tnt2, m-Ttn, Zasp	→ dysfonctionnement cardiaque	Dansithong et al., 2008

A partir du moment où il avait été montré que les répétitions CTG entraînaient des modifications d'expression de certaines protéines de liaison à l'ARN, différents modèles animaux ciblant en particulier MBNL1 et CUGBP1 ont été développés.

Ainsi, la délétion de l'exon 3 de MBNL1 est suffisante pour que les souris transgéniques MBNL^{*3/+3} de l'équipe du Dr. Kanadia développent à la fois une myotonie, le défaut de cataracte et les troubles musculaires (Kanadia *et al.*, 2003). Par l'établissement de ce modèle, la corrélation entre les manifestations cliniques comme la myotonie ou l'atrophie musculaire, et l'altération de l'épissage alternatif de quelques gènes tels que *CIC-1* ou *cTNT* a pu être établie. MBNL1 étant connu pour jouer un rôle majeur dans l'épissage alternatif, son inactivation mimée par la délétion de son exon 3 a permis d'associer certains symptômes de la DM1 à sa baisse d'activité dans les cellules malades. Ce modèle a également permis de vérifier le gain de fonction des ARNm DMPK comportant les répétitions CUG, et de confirmer l'hypothèse de la séquestration de MBNL1 au niveau des *foci* pour expliquer son manque de disponibilité (Miller *et al.*, 2000).

De la même façon, en se basant sur l'expression anormalement élevée de CUGBP1 dans les tissus DM1 et son implication dans les mécanismes de maturation des ARNs, des modèles de souris surexprimant CUGBP1 ont été créés afin de déterminer si l'augmentation de son niveau d'expression était responsable des troubles décrits dans la DM1. Le premier modèle a consisté à insérer l'intégralité de la région codante de CUGBP1 sous le contrôle du promoteur modifié de la α -actine, induisant une forte expression dans les muscles squelettiques, et plus modérément dans le cœur (Timchenko *et al.*, 2004). Ces souris transgéniques, exprimant 8 à 10 fois plus de CUGBP1, présentent des retards de développement, en particulier myogénique se traduisant par un défaut de fusion et d'altération des fibres musculaires. Cette inhibition de la myogenèse résulterait du taux élevé de p21 et de MEF2A (myocyte enhancer factor 2A), tous deux indispensables au développement myogénique. De façon intéressante, ces résultats combinés à une approche biochimique ont permis d'identifier le rôle de CUGBP1 dans la régulation de la traduction. Dans le second modèle, CUGBP1 a été placé sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase musculaire (MCK) qui restreint également son expression au niveau des muscles squelettiques et du cœur (Ho *et al.*, 2005). Confirmant le premier modèle, les souris transgéniques MCKCUG-BP1 présentent une forte mortalité néo-natale quand CUGBP1 est surexprimée d'un facteur 4 à 6. De façon intéressante, ces souris MCKCUG-BP1 présentent les mêmes profils d'épissage anormaux que les souris MBNL^{*3/+3} pour les gènes *CIC-1* et *cTNT*, et confirment ainsi le rôle antagoniste de MBNL1 et CUGBP1 qui avait été démontré dans un modèle cellulaire (Ho *et al.*, 2004).

2.2.2. Modèles cellulaires

Parallèlement aux modèles animaux, le développement de modèles cellulaires de la DM1 a permis de « disséquer » certains points spécifiques associés à la présence des CTG, tels que la formation des *foci*, les défauts d'expression de MBNL1 et CUGBP1 et leurs répercussions au niveau des anomalies d'épissage mais également, à un degré plus fonctionnel, d'identifier certaines anomalies cellulaires affectant par exemple la myogenèse ou la neurogenèse.

2.2.2.1. « Dissection » des anomalies moléculaires associées à la DM1

A l'aide de myoblastes primaires issus de patients DM1, Davis *et al.* ont ainsi pu démontrer que les ARNs mutants s'accumulaient au niveau des noyaux, empêchant leur export nucléaire (Davis *et al.*, 1997). C'est dans ce même système cellulaire que les défauts d'accumulation de CUGBP1 et de séquestration nucléaire de MBNL1 ont également été mis en évidence (Ho *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2000; Timchenko *et al.*, 2001a). Ces défauts ont pu être également reproduits après surexpression de répétitions CTG (Mankodi *et al.*, 2000; Orengo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007). Les protéines MBNL1 et CUGBP1 étant connues pour être largement impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif en se fixant à des séquences spécifiques de divers pré-ARNm, l'altération de leur activité peut fortement perturber la balance d'expression des différentes isoformes de ces ARNm et induire des anomalies phénotypiques très variées.

Par la création de minigènes constitués des exons subissant un épissage anormal dans la DM1 et de leurs séquences introniques adjacentes, les motifs de fixation et les rôles antagonistes de MBNL1 et CUGBP1 ont pu être mis à jour (Ho *et al.*, 2004). En effet, cette étude montre que CUGBP1 favorise l'inclusion de l'exon 5 de cTNT et l'épissage de l'exon 11 du récepteur à l'insuline alors que l'action de MBNL1 à l'effet inverse. Ces travaux confirment comme de nombreux autres l'hypothèse de la séquestration de MBNL1 au niveau des *foci* puisque l'extinction de MBNL1 par l'utilisation de siRNAs aboutit aux défauts d'épissage classiques rencontrés dans la DM1. De plus, bien qu'ayant des effets antagonistes sur l'épissage alternatif, ces protéines n'agissent pas l'une sur l'autre. Cette propriété a pu être démontrée en se focalisant sur l'action d'une de ces protéines après surexpression ou diminution de l'autre dans les différents modèles de KO murins (Ho *et al.*, 2005; Kanadia *et al.*, 2003) ou cellulaires (Dansithong *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2004).

2.2.2.2. « Dissection » de certains défauts fonctionnels associés à la DM1

2.2.2.2.1. Anomalies musculaires

L'utilisation de myoblastes primaires a également permis de confirmer les phénotypes musculaires aberrants observés chez les patients (Amack et Mahadevan, 2001). Ainsi, différentes études ont

montré que les myoblastes issus de patients DM1 ont 1) une capacité réduite de fusionner pour donner des myotubes 2) forment des myotubes immatures de taille et de morphologie différentes que les contrôles (Furling *et al.*, 2001; Timchenko *et al.*, 2001a). Ces résultats ont été étendus à la lignée myogénique transformée murine C2C12 (Amack et Mahadevan, 2004). Dans la mesure où ces cellules sont plus faciles à manipuler et amplifier, un certain nombre de travaux, basés sur la surexpression de répétitions CTG ou la diminution d'expression de la DMPK, ont été effectués. Cependant, les mécanismes de ces anomalies restent non élucidés. Plusieurs hypothèses ont été postulées pour expliquer ce défaut de différenciation myogénique : 1) incapacité à sortir du cycle cellulaire due à la diminution de l'expression de p21 par CUGBP1 (Timchenko *et al.*, 2001b), 2) Une diminution de l'expression de MyoD (Amack *et al.*, 2002) par un mécanisme non élucidé, 3) L'absence d'expression de la DMPK induirait une diminution d'expression de la myogénine (Harmon *et al.*, 2008).

Des travaux plus récents indiquent également des anomalies fonctionnelles des cellules satellites, impliquées dans les processus de régénération musculaire, au niveau des muscles distaux de patients DM1 (Thornell *et al.*, 2009). Ces dernières présenteraient des capacités prolifératives réduites probablement dues à une accumulation anormale de p16 (Bigot *et al.*, 2009).

2.2.2.2. Anomalies du système nerveux

Dans le cadre des affections du système nerveux, plusieurs modèles cellulaires ont également été développés. Par exemple, des cellules PC12 ayant subi une transfection stable de 90 répétitions CTG présentent des difficultés à se différencier dans la voie neuronale. Ce défaut de différenciation pourrait être la conséquence de l'épissage anormal de TAU ou de l'hyperphosphorylation de sa protéine (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2006), ou de l'inhibition de l'expression du canal neuronal au calcium qui serait capable d'expliquer les anomalies de croissance neuritique de ces cellules (Andrade *et al.*, 2007).

Toutefois, dans le cas des anomalies neuronales reliés à la DM1, l'absence de modèles cellulaires pertinents a à regretter. Aucun modèle de cultures primaires de neurones n'a été réalisé à partir des modèles de souris DM1, ce qui permettrait de voir les potentielles répercussions fonctionnelles de la mutation dans ce type cellulaire. En particulier, l'affection des motoneurones est peu décrite dans le cas de la DM1. Pourtant comme son nom l'indique, cette pathologie se caractérise principalement par un défaut de communication entre le motoneurone et sa cible musculaire. Ce n'est que récemment que la présence de *foci* a été détectée dans ce type cellulaire chez des biopsies de patients DM1 (Wheeler *et al.*, 2007). Cependant, les conséquences physiopathologiques de cette observation sont inconnues. Le développement de multiples modèles est primordial pour la compréhension des mécanismes complexes impliqués dans la DM1, mais ils représentent également des outils essentiels pour la

découverte de molécules à potentiel thérapeutique. En effet, en reproduisant les anomalies observées dans la DM1 de diverses manières, ils offrent l'opportunité à des études de criblage de pouvoir valider efficacement leurs composés après les avoir testées sur plusieurs modèles. Par exemple, dans le cadre de la correction de la myotonie par restauration du bon profil de l'épissage de CLCN1, une étude récente a criblé plus de 13 000 molécules sur des fibroblastes et des myoblastes issus de patients contenant 5 ou 1000 répétitions CTG et rendus immortalisés par ré-expression de la télomérase (O'Leary *et al.*).

2.3. Avantages et limitations des modèles existants

2.3.1. Avantages et limites des modèles animaux

L'organisme dans son intégralité correspond au plus haut degré de complexité de modélisation. Puisqu'il n'est ni concevable, ni autorisé de procéder à une expérimentation chez l'homme avant la phase I d'essais cliniques, l'expérimentation animale s'est développée en même temps que les avancées dans le domaine de la transgénèse. La conception d'animaux transgéniques, notamment murins, a apporté une meilleure compréhension des processus biologiques. Par exemple, dans des souris transgéniques, l'invalidation d'expression d'un gène (« knock-out ») ou son insertion (« knock-in ») par la technique de recombinaison homologue a permis d'associer des phénotypes et des fonctions à des gènes dont les rôles restaient inconnus (Hickman-Davis et Davis, 2006). Ces souris ont également été utilisées comme modèle pour étudier divers troubles pathologiques (Zambrowicz et Sands, 2003). Bien qu'ils soient largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique comme dans des tests de molécules thérapeutiques (Snaith et Tornell, 2002), ces modèles présentent également des inconvénients comme leur temps de conception, leur coût de développement et d'entretien, et surtout l'éventuelle mise en place de mécanismes de compensation par l'organisme.

2.3.2. Avantages et limites des systèmes cellulaires

Plusieurs systèmes cellulaires sont couramment utilisés comme modèles. Ainsi, il est possible d'avoir recours à des cellules primaires, des cellules immortalisées. Contrairement aux cellules immortalisées qui sont aneuploïdes, les cellules primaires sont génétiquement normales et ont l'avantage de présenter toutes les caractéristiques phénotypiques du tissu dont elles sont issues. C'est pourquoi elles constituent un modèle pathologique de qualité malgré leur variabilité phénotypique et leur faible disponibilité due à l'accès difficile de certains tissus. En revanche, à cause de leur capacité d'amplification limitée à quelques passages et au phénomène de dédifférenciation qu'elles subissent fréquemment dès leur mise en culture *ex vivo*, elles représentent un modèle difficilement compatible pour certaines approches comme la recherche de molécules thérapeutiques par criblage à haut débit (HTS).

Afin de palier à ce manque de disponibilité cellulaire ou aux types cellulaires qui ne peuvent pas être prélevés, des cellules immortalisées ont été développées. Ces dernières sont capables de croître et de se diviser indéfiniment par l'induction de la surexpression de l'antigène T du virus simien 40 (SV-40) ou par l'expression de la transcriptase inverse de la télomérase (TERT) (Greider et Blackburn, 1985). Néanmoins, à cause de cette manipulation génétique, ces cellules présentent fréquemment des anomalies caryotypiques ainsi que des différences phénotypiques par rapport à leur tissu d'origine rendant leur utilisation comme modèle pathologique difficile.

La communauté scientifique a donc recherché de nouveaux modèles cellulaires qui combindraient une forte capacité d'auto-renouvellement tout en conservant normalement son patrimoine génétique. Les cellules souches semblaient être un modèle de choix puisqu'elles permettent de palier aux différents désavantages présentés par les autres systèmes cellulaires.

Les cellules souches adultes qui peuvent être issues de nombreux tissus matures (Davila *et al.*, 2004), sont génétiquement normales et présentent un plus fort potentiel de prolifération que des cellules classiques. Elles présentent également un potentiel de différenciation mais qui est généralement limité aux tissus dont elles sont issues.

Les cellules souches pluripotentes présentent l'avantage d'être diploïdes, de présenter un caryotype stable et peuvent être disponibles en quantité illimitée de part leur capacité à être maintenues en culture sur de longues périodes (McNeish, 2004; Pooga *et al.*, 2001; Pouton et Haynes, 2005). Comme décrit plus en détail dans le chapitre suivant, une des caractéristiques principales de ces cellules est leur pluripotence, à savoir la possibilité de se différencier, en théorie, dans tous les types cellulaires de l'organisme. De part cet ensemble de propriété, les cellules souches pluripotentes sont apparues comme une source intéressante pour développer des modèles fonctionnels à différents stades développementaux pour tous les types cellulaires où les protocoles de différenciation sont maîtrisés et reproductibles. Outre leur potentiel en thérapie substitutive, leur potentiel pour des applications de modélisation pathologique est devenu possible grâce à l'obtention de lignées qui ont été établies à partir d'embryons écartés au cours de diagnostic préimplantatoire (DPI), due à la présence d'une mutation causale d'une pathologie (Eiges *et al.*, 2007). Ceci permet de disposer de cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) présentant les caractéristiques génétiques de cette pathologie et donc d'atteindre sans induction préalable de transgène, un degré de similitude plus élevé entre le modèle pathologique et le patient (Mateizel *et al.*, 2006; Verlinsky *et al.*, 2005). Cependant, l'utilisation courante de ces cellules pose de nombreuses questions éthiques du fait de leur dérivation à partir du blastocyste de l'embryon.

La démonstration récente de reprogrammation de fibroblastes de peau à un état pluripotent par

l'introduction dans ces derniers de gènes impliqués dans la pluripotence (Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi et Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007) offre un nouveau type de modèle cellulaire (Colman et Dreesen, 2009). Ces cellules, appelées cellules souches pluripotentes induites (iPS), permettent à la fois d'écarter les différents problèmes éthiques posés par les CSEh et de disposer de modèles pathologiques encore inexistants puisque toutes les maladies génétiques ne sont pas diagnostiquées par DPI (Dimos *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Par exemple, l'étude de l'équipe du Dr. Lee a généré des iPSCs spécifiques de patients pour modéliser une pathologie du système nerveux périphérique (SNP), la dysautonomie familiale. Dans ces travaux, le potentiel de différenciation de ces iPSCs est testé et la recherche du mécanisme responsable de la maladie est réalisée en étudiant le niveau d'expression d'un facteur de régulation (IKBKAP). Enfin, les lignées cellulaires sont utilisées pour valider *in vitro* l'effet de molécules thérapeutiques candidates (Lee *et al.*, 2009). Toutefois, comme cela sera détaillé ultérieurement, leur utilisation doit être contrôlée à cause du manque de recul des études portant sur la réactivation des virus.

3. Modélisation pathologique à l'aide de cellules souches pluripotentes humaines

3.1. Les cellules souches pluripotentes

Comme mentionné précédemment, les deux sources de cellules souches pluripotentes (CSP) utilisées sont les CSE, dérivées à partir des premiers stades du développement, et les iPS, obtenues après reprogrammation de cellules somatiques. La très grande majorité du travail contenu dans ce mémoire ayant été réalisé à partir de CSEh, ces dernières seront détaillées plus en détail dans ce chapitre.

3.1.1. Les cellules souches embryonnaires humaines

3.1.1.1. Origine et dérivation

Les premières lignées de CSE ont été dérivées à partir d'embryon de souris en 1981 par deux équipes indépendantes (Martin *et al.*, 1981; Robertson *et al.*, 1983). Il a fallu attendre les années 1995 et 1998 pour que la technique de dérivation soit appliquée respectivement aux primates non-humains et à l'Homme (CSEh) (Thomson *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 1995). Depuis, de nombreuses autres lignées de CSEh ont été établies à partir d'embryons surnuméraires, issus de fécondation *in vitro* dont le projet parental a été abandonné.

Ces cellules sont isolées chez l'homme entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour du développement embryonnaire, à partir de la masse cellulaire interne des blastocystes issus d'un DPI (Figure 21). A ce stade, l'embryon est composé d'une zone pellucide, des cellules du trophoblaste à l'origine des structures extra-embryonnaires comme le placenta ou le cordon ombilical, d'une cavité remplie de liquide, le blastocèle et des cellules de la masse cellulaire interne (Semb, 2005).

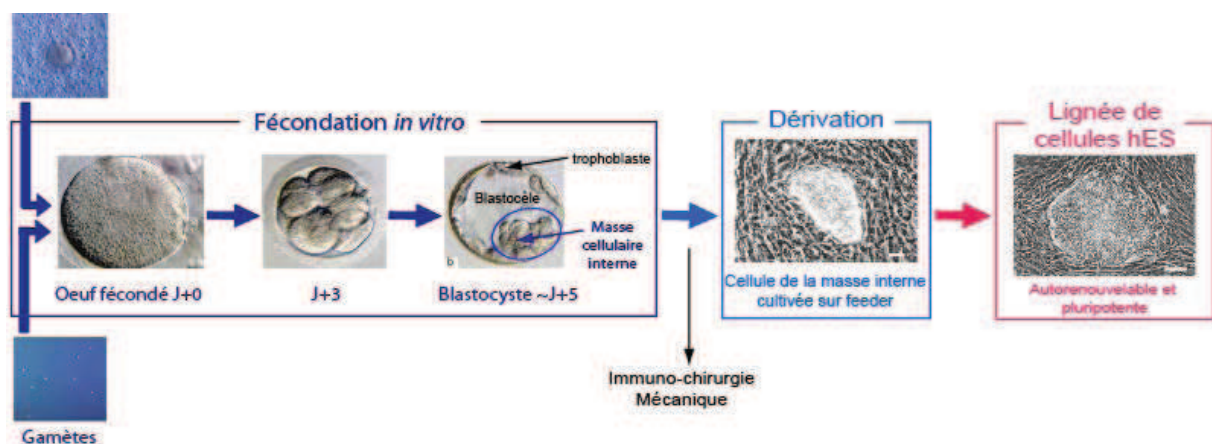


Figure 21 : Schéma illustrant la dérivation d'une lignée de cellules souches embryonnaires humaines.

Ces cellules sont définies comme étant pluripotentes puisqu'elles sont à l'origine de tous les types cellulaires composant l'organisme y compris les cellules germinales. Leur isolation du reste du blastocyste peut se réaliser par différentes méthodes de dérivation. La première et la plus couramment utilisée est basée sur une technique d'immunochirurgie où le trophoctoderme est lysé par des réactions anticorps-complément après digestion enzymatique de la zone pellucide (Thomson *et al.*, 1998). Les autres se fondent sur une séparation mécanique où des embryons entiers ou partiels sont déposés sur des cellules nourricières et mis en culture (Amit et Itskovitz-Eldor, 2002; Heins *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2005). Ces techniques comportent toutefois le risque d'une sur-prolifération des cellules du trophoblaste. Bien qu'il soit également possible de dériver des CSEh plus précocement, à partir du stade morula constitué de 8 cellules ou blastomères, l'efficacité de dérivation reste très faible (Klimanskaya *et al.*, 2006; Klimanskaya *et al.*, 2007). Une fois dérivées, les CSEh sont cultivées sur cellules nourricières dans des conditions spécifiques qui assurent leur prolifération et leur maintien à l'état indifférencié.

3.1.1.2. Bioéthique et recherche sur les CSEh

La considération de l'embryon humain comme matériel de laboratoire fait que, depuis 1998, date à laquelle les premières CSEh ont été isolées, la recherche sur les CSEh est éthiquement controversée. A cette question éthique s'ajoutent plusieurs craintes qui sont suscitées par l'utilisation de ces cellules comme celles de la quête de l'immortalité régénérative, le clonage humain, ou la création de modèle de recherche hybride homme-animal (« cybrides ») obtenus par insertion d'un noyau de cellule humaine dans un ovule animal.

En France, la question du statut juridique de l'embryon humain a régulièrement été posée depuis la loi du 17 janvier 1975 relative à l'interruption volontaire de grossesse. Afin d'empêcher l'instrumentalisation de l'embryon, considéré comme une personne humaine potentielle, la loi du 29 juillet 1994 a interdit « les expérimentations sur l'embryon » et seulement autorisé les « études » ne lui portant pas atteinte. Ce n'est que devant les perspectives de l'énorme potentiel thérapeutique offert par les CSEh pour mieux comprendre et traiter des maladies graves ou incurables ou encore des affections de l'embryon ou du fœtus que le débat a été de nouveau traité le 6 août 2004 et que la recherche sur l'embryon est ainsi devenue possible par dérogation à un interdit légal. Ces autorisations de recherche sur l'embryon et les CSEh n'ont été données qu'à titre dérogatoire et temporaire uniquement pendant un délai de 5 ans à compter de la publication de ce décret d'application (n°2006-121) le 7 février 2006, et sous des conditions extrêmement contrôlées. Ainsi, ces recherches « doivent cumulativement être susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs (article R. 2151-1) et de ne pas pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques ». De plus, les protocoles de recherche doivent avoir été autorisés par l'Agence de la

Biomédecine. Pour cela, cet établissement public national de l'État créé par la loi de bioéthique de 2004, se base sur la pertinence scientifique du projet de recherche, ses conditions de mise en œuvre au regard des principes éthiques et son intérêt pour la santé publique. Toutefois, la décision finale d'autorisation appartient au ministre de la Santé et de la Recherche qui peut interdire ou suspendre un protocole après l'avis du conseil d'orientation.

Les recherches ne peuvent être menées qu'à partir d'embryon conçu *in vitro* dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et qui ne fait plus l'objet d'un projet parental. De plus, il doit y avoir un consentement écrit préalable des parents qui doit être confirmé à l'issue d'un délai de réflexion de trois mois. Enfin, les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent pas être transférés à des fins de gestations. C'est dans ces conditions que l'Agence de la Biomédecine a autorisé plusieurs équipes de recherche françaises à dériver de nouvelles lignées de CSEh dont la première fut attribuée au Dr M. Peschanski et au Pr S. Viville le 19 juin 2006, pour la dérivation et l'amplification de lignées de CSEh porteuses de mutations à l'origine de maladies monogéniques.

3.1.1.3. Caractérisation et propriétés des CSEh

Les CSEh présentent certaines caractéristiques qui les rendent originales et uniques. Tout d'abord, au niveau morphologique, elles sont reconnaissables par leur petite taille (2-3•m) et leur rapport nucléo-cytoplasmique élevé. En culture, elles se distinguent rapidement des cellules nourricières sur lesquelles elles sont cultivées en se regroupant en colonies compactes et plates. De part leur caractère souche, ces cellules indifférenciées, possèdent un fort potentiel de différenciation et sont théoriquement capables de s'autorenouveler à l'infini. Ce caractère très prolifératif est attribué à leur forte expression de la télomérase (TERT : telomerase reverse transcriptase) qui empêche l'entrée des cellules en sénescence en sauvegardant la longueur des télomères (Morrison *et al.*, 1996). Toutefois, il semble que leur particularité à maintenir un caryotype stable au cours de leurs multiples passages (Rosler *et al.*, 2004) dépende de leur condition de culture ou de facteurs intrinsèques puisque de plus en plus d'anomalies caryotypiques sont décrites après de longues période de culture *in vitro* (Baker *et al.*, 2007; Lefort *et al.*, 2008; Maitra *et al.*, 2005). Par ces propriétés d'auto-renouvellement et de pluripotence, les CSEh présentent également un statut épigénétique et un profil d'expression de microARNs particuliers (Chen et Daley, 2008).

Au niveau moléculaire, les CSEh sont identifiables par l'expression d'un ensemble de marqueurs de surface dont les plus utilisés pour les caractériser sont SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen), SSEA-3, TRA-1-60 (Tumour Rejection Antigen), TRA-1-81, CD9, AC133, flt3 (CD135), et c-kit (CD117). De plus, les CSEh expriment des facteurs de transcription qui leurs sont propres comme Oct3/4 (POU5F1), Nanog, Sox2, Foxd3, ou Fgf4, tous impliqués dans la maintenance de leur

état de pluripotence. Parmi eux, *Oct3/4*, *Nanog* et *Sox2* qui agissent de concert (Loh *et al.*, 2006; Masui *et al.*, 2007), sont indispensables à l'auto-renouvellement tout en maintenant leur pluripotence. La diminution de leur expression marque l'entrée des cellules dans leurs phases de différenciation (Jaenisch et Young, 2008; Stewart *et al.*, 2006).

Les mécanismes signalétiques gouvernants ces processus d'autorenouvellement et de pluripotence font également l'objet de recherches intensives même si certaines voies ont déjà été identifiées (Figure 22) (Stewart *et al.*, 2006).

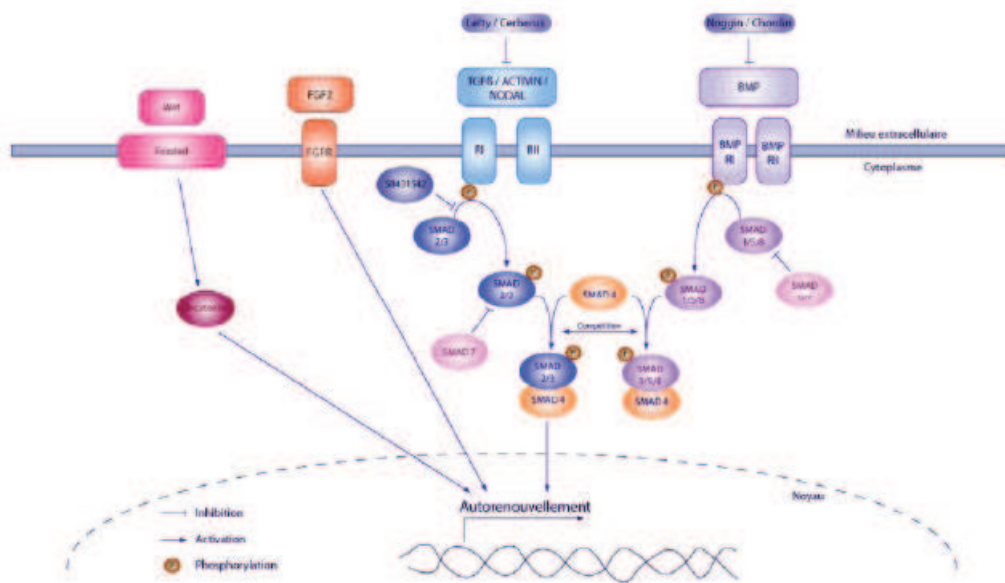


Figure 22 : Schéma présentant les principales voies de signalisation impliquées dans l'autorenouvellement des CSEh (Stewart *et al.*, 2006).

Ainsi les voies Wnt/ β -caténine, FGF, et Activin/Nodal apparaissent essentielles au maintien de ces deux propriétés. Par exemple, le FGF2 est un élément indispensable pour maintenir les CSEh à l'état indifférencié. Celui-ci pourrait agir en stimulant la synthèse de composés de la matrice extracellulaire (Kim *et al.*, 2005), ou en inhibant la voie BMP (Aubin *et al.*, 2004) qui sont des composés appartenant à la famille du TGF β , et qui interviennent dans la différenciation des CSEh vers le feuillet mésodermique (Sumi *et al.*, 2008). De même, l'indifférenciation des CSEh est contrôlée par la voie Activin/nodal puisque l'inhibition de celle-ci par le SB431542 conduit à la différenciation des CSEh (Vallier *et al.*, 2005). Enfin, la voie Wnt/ β -caténine semble être importante dans la conservation de la pluripotence des cellules puisque la liaison de Wnt à son récepteur inhibe la dégradation intracellulaire de la β -caténine qui agit comme coactivateur de la transcription de *Oct3/4* ou *Nanog* (Stewart *et al.*, 2006). Toutefois, cette voie interviendrait plutôt dans la prolifération que dans le maintien de l'état indifférencié (Stewart *et al.*, 2006).

3.1.1.4. Culture des CSEh

Les CSEh sont classiquement cultivées sur une monocouche de fibroblastes embryonnaires murins (MEF, *murine embryonic fibroblasts*) dont le cycle cellulaire a été préalablement interrompu par traitement à la mitomycine C ou par irradiation. Toutefois, d'autres cellules nourricières peuvent être utilisées, telles que des lignées de cellules murines (STO) ou encore des fibroblastes humains provenant de prépuce (cellules foreskin) (Mallon *et al.*, 2006). Le rôle exact de ces cellules n'est pas encore complètement déterminé, mais il semble qu'elles jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'état indifférencié et la croissance des CSEh en libérant divers facteurs solubles dans le milieu de culture tels que l'activin A (Eiselleova *et al.*, 2008). Afin de ne pas induire la différenciation des CSEh vers différents types cellulaires, le sérum classiquement utilisé en culture est remplacé du KSR (*Knock-out Serum Replacement*). Les CSEh requièrent la présence de FGF2 dans le milieu de culture pour conserver leur indifférenciation. Ce facteur doit être ajouté quotidiennement pour assurer le maintien phénotypique des cellules. Leur importante prolifération pouvant les induire en différenciation et leur faire perdre leur pluripotence, il est fondamental de les changer de support régulièrement. Le passage des CSEh peut être réalisé par dissociation mécanique ou par dissociation enzymatique (Hoffman et Carpenter, 2005). Toutefois, l'utilisation de composés tels que la dispase ou la trypsine semble augmenter les risques d'anomalies chromosomiques comme les trisomie 12 ou 17 (Brimble *et al.*, 2004; Hoffman et Carpenter, 2005).

La pluripotence des CSEh peut être démontrée *in vitro* et *in vivo* par deux approches distinctes. *In vitro*, les CSEh peuvent se regrouper en structures tridimensionnelles pour former des corps embryoides (EBs, *embryoid bodies*) (Figure 23). Ces agrégats cellulaires sont composés de cellules appartenant aux trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). *In vivo*, la xénogreffe de CSEh à des rongeurs immunodéprimés conduit à la formation de tératomes composés de types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires (Heins *et al.*, 2004).

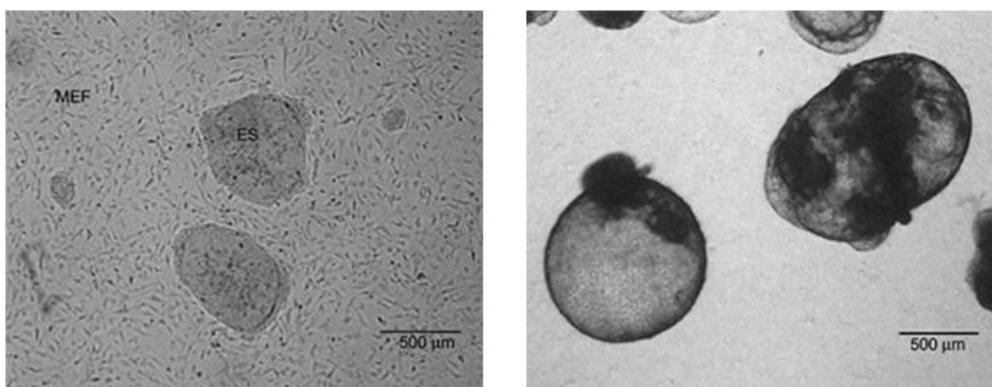


Figure 23 : Photographies de colonies de CSEh indifférenciées (gauche) et de corps embryoides (droite)

En se basant sur les voies de différenciation connues chez le poulet et la souris, mais aussi sur l'expression de différents facteurs de transcription qui induisent la différenciation vers des types cellulaires spécifiques au cours du développement embryonnaire, les CSEh ont pu être différenciées *in vitro* vers de multiples types cellulaires (Tableau 10). En effet, de nombreuses publications ont rapporté la possibilité de produire un grand nombre de phénotypes cellulaires tels que des cellules gliales (Hong *et al.*, 2008; Reubinoff *et al.*, 2001), divers sous-types de neurones (Hong *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007a; Perrier *et al.*, 2004), des cardiomyocytes (Mummery *et al.*, 2007), des précurseurs hématopoïétiques (Chadwick *et al.*, 2003), des cellules sécrétrices d'insuline (D'Amour *et al.*, 2006), ou encore des hépatocytes (Baharvand *et al.*, 2008).

Feuillet	Type cellulaire	Référence
Cellules germinales	Gamètes	Aftatounian <i>et al.</i> , 2006
Ectoderme	Progéniteurs neuraux	Barberi <i>et al.</i> , 2003 Li <i>et al.</i> , 2005
	Neurones	
	Astrocytes	
	Oligodendrocytes	
	Kératinocytes	Iuchi <i>et al.</i> , 2006
Mésoderme	Cardiomyocytes	Harding <i>et al.</i> , 2006
	Cellules du muscle squelettique	Chan <i>et al.</i> , 2006
	Cellules du muscle lisse	Huang <i>et al.</i> , 2006
	Cellules hématopoïétiques	Wang <i>et al.</i> , 2005
	Cellules endothéliales	Wang <i>et al.</i> , 2006
Endoderme	Hépatocytes	Lavon <i>et al.</i> , 2004
	Cellules pancréatiques (• et •)	Segev <i>et al.</i> , 2004

Tableau 10 : Tableau illustrant le potentiel de différenciation pluripotent des CSEh *in vitro*.

3.1.2. Les cellules souches pluripotentes induites

La démonstration, en 2006, de la possibilité de reprogrammer une cellule somatique en cellule pluripotente a entraîné un fort enthousiasme dans la communauté scientifique dans la mesure où ces cellules peuvent être obtenues à partir de cellules somatiques de patients souffrants de diverses pathologies (Figure 24). Elles ont également l'avantage de pouvoir être dérivées de personnes affectées par des maladies génétiques qui ne font pas l'objet de DPI et dont il est impossible de

disposer de lignée de CSE, comme c'est le cas pour certaines maladies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique (Dimos *et al.*, 2008), atrophie musculaire spinale (Ebert *et al.*, 2009) ou la maladie de Parkinson (Park *et al.*, 2008)).

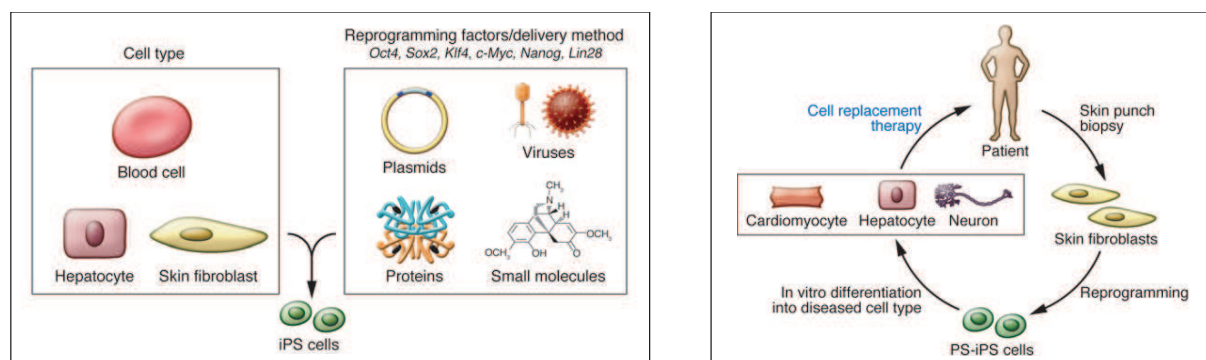


Figure 24 : Schémas illustrant la génération d'iPS et leur utilisation potentielle en thérapie cellulaire. La figure de gauche présente les différentes cellules et les multiples outils pouvant servir à l'élaboration d'iPS ; la figure de droite montre le possible processus clinique futur envisagé à partir de ces cellules (Kiskinis et Eggan).

Depuis les premières reprogrammations réalisées sur des fibroblastes de souris (Takahashi et Yamanaka, 2006) et des fibroblastes humains (Takahashi *et al.*, 2007) par l'intermédiaire de vecteurs rétroviraux introduisant Oct4, Sox2 (SRY box-containing gene 2), Klf4 (Kruppel-like factor 4) et c-Myc dans les cellules, plusieurs autres méthodes d'insertion et divers cocktails de transgènes ont été développés. Ainsi, certaines équipes ont obtenu des iPSCs humaines en contraignant les cellules à exprimer Oct4, Sox2, Nanog et Lin28 par une approche lentivirale (Yu *et al.*, 2007), alors que d'autres ont utilisé des plasmides (Kaji *et al.*, 2009), ou des transposons piggyBac (Woltjen *et al.*, 2009). Cette dernière approche pourrait être une alternative aux vecteurs viraux dont l'intégration des différents transgènes dans le génome rend l'utilisation des iPSCs inappropriée pour des applications thérapeutiques. En effet, le risque potentiel de réactivation de l'expression des transgènes ainsi que la non maîtrise des sites d'intégration dans le cas des approches virales (Dimos *et al.*, 2008; Ebert *et al.*, 2009) pourraient être oncogéniques (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008) et induire la formation de tératomes.

Face à ces problèmes de sécurité (Jalving et Schepers, 2009), d'autres études se sont tournées vers des approches non intégratives comme l'utilisation de vecteurs épisomaux (Yu *et al.*, 2009), la production de protéines recombinantes (Zhou *et al.*, 2009) ou la compensation de ces gènes par des petites molécules (Lyssiotis *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2008). Néanmoins, celles-ci restent pour le moment inefficaces comparées aux approches virales. Enfin, d'autres approches visent également à pallier aux

difficultés liées à l'insertion aléatoire ou aux faibles rendements de la recombinaison homologue en utilisant des nucléases à doigt de zinc (Zou *et al.*, 2009).

Toutefois, malgré les nombreuses études qui ont démontré qu'elles étaient très similaires aux CSE (Amabile et Meissner, 2009; Maherali *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2007), leur profil d'expression génique et épignétique présentent quelques différences avec celles-ci (Tableau 11) (Chin *et al.*, 2009; Soldner *et al.*, 2009).

	iPS cells	ES cells
Reported in humans	Yes	Yes
Embryos or donor oocytes required	No	Yes
Stemness markers* expressed	Yes	Yes
Teratomas produced	Yes	Yes
Utility as a research tool	Allows repeated development	Allows the study of development
Can be used as models for human diseases	Yes	Some
Can be used in a screen to identify drugs	Yes	Yes
Variable fates	Likely	Yes
Develop into specific human tissues	To be shown	Yes
Genetically match the patient	Unknown	No
Additional information	Cells are genetically modified in current methods	Cells are allogeneic and might cause immune rejection

Tableau 11 : Tableau de comparaison entre les CSE et les iPS (Nishikawa *et al.*, 2008).

Concernant leur potentiel de différenciation, il semblerait que les IPS présentent quelques différences dans leur capacité à générer des types cellulaires spécialisés par rapport aux CSE *in vitro*, suggérant qu'une adaptation de protocoles doit être envisagée (Morizane *et al.*, 2009; Tokumoto *et al.*, 2010). Cette différence, identifiée principalement avec les cellules murines, ne pourrait être due qu'aux variations existantes entre les lignées (Tokumoto *et al.*, 2010).

Plusieurs protocoles permettant d'induire et de différencier les CSEh dans la voie neuronale ont pu être développés au cours de la dernière décennie en regroupant les connaissances sur le développement embryonnaire de plusieurs espèces, ainsi que les données de protocoles utilisant des cellules souches

neurales adultes ou des CSE de souris. Le processus de différenciation des CSE en motoneurones sera plus particulièrement détaillé dans la partie suivante en se basant tout d'abord sur les connaissances *in vivo*, dans la mesure où une partie de travail présenté dans ce mémoire a porté sur l'utilisation de motoneurones issus de CSEh. En effet, comme mentionnée dans la partie 2 de cette introduction, nous nous sommes intéressés à ce type neuronal dans la mesure où les conséquences fonctionnelles de la mutation DM1 au sein de la population motoneuronale étaient peu connues.

3.2. Développement de la moelle épinière et des motoneurones

L'établissement du SNC se réalise avec une remarquable précision au cours du développement embryonnaire et implique une multitude de mécanismes complexes dont beaucoup restent encore aujourd'hui non élucidés. La neurogenèse, se définissant par la progression des cellules ectodermiques naïves vers un stade de neurones post-mitotiques, a pu être divisée en quatre étapes distinctes : (1) la compétence, les cellules de l'ectoderme pourront devenir des précurseurs neuraux si elles sont soumises à une combinaison de signaux appropriés ; (2) la spécification, l'intervention de facteurs inhibiteurs de la voie neurale peut encore changer la destinée des cellules ayant reçues les signaux pour devenir des précurseurs neuraux ; (3) la détermination (« commitment »), où ces mêmes cellules continueront leur progression neuronale même si elles sont exposées à des inhibiteurs de la voie neurale ; (4) et enfin la différenciation, étape à laquelle les précurseurs neuronaux quittent le cycle cellulaire pour devenir des neurones post-mitotiques exprimant certains marqueurs spécifiques (Wilson et Edlund, 2001).

3.2.1. Première étape du développement du SNC

La neurogenèse et plus globalement la morphogenèse du SNC sont des processus très précoces qui débutent, chez l'homme, dès le 19^{ème} jour du développement embryonnaire avec le développement de la plaque neurale. Elles aboutissent vers la 12^{ème} semaine par l'achèvement des divisions principales du SNC et l'établissement de la quasi-totalité des structures cérébrales. La maturation de ces structures impliquant l'élaboration des réseaux neuronaux et la production d'interneurones s'effectue jusque dans l'enfance et même au-delà de la puberté (Hatten, 1999).

Chez les vertébrés, le système nerveux se développe après la gastrulation, à partir de la couche de cellules n'ayant pas subies l'invagination de la blastula, c'est-à-dire à partir de l'ectoderme. Les cellules ectodermiques situées le long de la ligne médiane donnent naissance à la plaque neurale (induction neurale) tandis que celles situées latéralement sont à l'origine de l'épiderme. La genèse de cette plaque neurale, résulte d'un épaissement localisé de l'ectoderme selon un axe antéropostérieur. Une dépression médiane longitudinale des parois du sillon en formation qui s'étend de la partie rostrale à la partie caudale de cette plaque aboutit à l'élaboration de la gouttière neurale dont le

rapprochement et la fusion des bords est à l'origine du tube neural primitif. Le reste de l'ectoderme, à l'origine de l'épiderme, recouvre dorsalement le tube neural. Lors de la séparation du tube neural de l'ectoderme, un nouveau groupe de cellules s'isole et s'organise en deux bandes longitudinales de part et d'autre du tube neural et forment les crêtes neurales. Cette structure est à l'origine des neurones du SNP tandis que le tube neural donne naissance au SNC.

Les parois du tube neural sont tapissées de cellules neuroépithéliales organisées en un neuroépithélium cylindrique. Ces cellules sont des précurseurs neuraux multipotents à l'origine des neurones et des cellules gliales. Enfin, sous l'influence d'une cascade moléculaire complexe, impliquant de nombreux signaux développementaux, les cellules du tube neural subissent une multiplication intense ainsi qu'une spécification régionale. Ce processus entraîne vers la 5^{ème} semaine la subdivision progressive du tube neural en trois vésicules : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale.

Les principales voies de signalisation impliquées dans l'induction neurale sont la voie des TGF• (Tumor Growth Factor •), incluant les BMPs (Bone Morphogenic Protein) et Nodal, la voie des FGFs (fibroblast growth factors), la voie Wnt-•-catenin et la voie Notch (Gaulden et Reiter, 2008). Durant la gastrulation, la plaque neurale est induite par la notochorde qui sécrète des substances telles que la follistatine, chordin et noggin qui inhibent la sécrétion de la BMP4, responsable de l'inhibition de la transformation des cellules ectodermiques en cellules neurales (Figure 25).

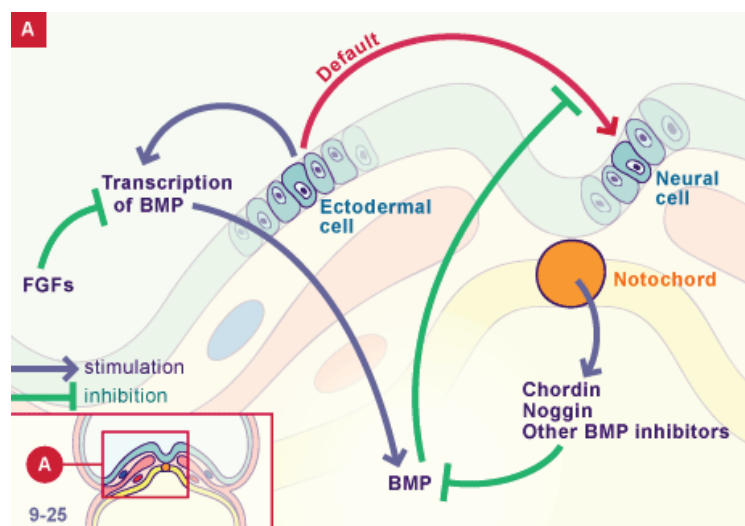


Figure 25 : Représentation schématique des voies moléculaires de l'induction neurale chez l'embryon vertébré. Par défaut, les cellules ectodermiques s'orientent dans la voie neurale. Toutefois, cette différenciation neurale peut être inhibée par les BMPs provenant des cellules ectodermiques. Ces BMPs sont inhibées avant la gastrulation par les FGFs, et au cours de la gastrulation par Noggin ou chordin, qui sont sécrétées par la notochorde (d'après <http://www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete02.html>).

En revanche, si le rôle des BMPs fait consensus dans la communauté scientifique, celui des autres voies de signalisation est plus discuté. En effet, la voie Wnt/ \bullet -catenin semble être importante au stade blastula pour induire l'expression des antagonistes des BMPs alors que son inhibition serait également nécessaire à un stade plus tardif pour permettre l'induction neurale. Les voies FGFs et Notch sembleraient avoir une activité pro-neurale, et l'expression de certains facteurs tels que les gènes *Sox1*, *Sox2* paraît également être importante au cours du développement du SNC (Bylund *et al.*, 2003; Kan *et al.*, 2004).

3.2.2. Spécification neuronale de la moelle épinière

C'est au cours de la neurulation que la moelle épinière se différencie à partir de la partie caudale du tube neural en arrière du rhombencéphale. Elle atteint sa configuration définitive entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaine de développement. A ce stade, elle est entourée d'une enveloppe méningée et enclavée dans le canal vertébral, ou canal rachidien qui est formé par l'empilement des vertèbres et qui constitue l'étui osseux de protection de la moelle, des méninges et des racines rachidiennes, et dont le développement perdure après le 4^{ème} mois, date à laquelle la croissance du tube neural ralentit.

Structurellement, la moelle est un organe segmentaire. Elle est composée de segments cervicaux, thoraciques, lombaires, sacraux et coccygiens. A chaque segment correspond l'émergence de deux racines motrices ventrales et de deux racines sensibles dorsales avec leur ganglion rachidien (Figure 26).

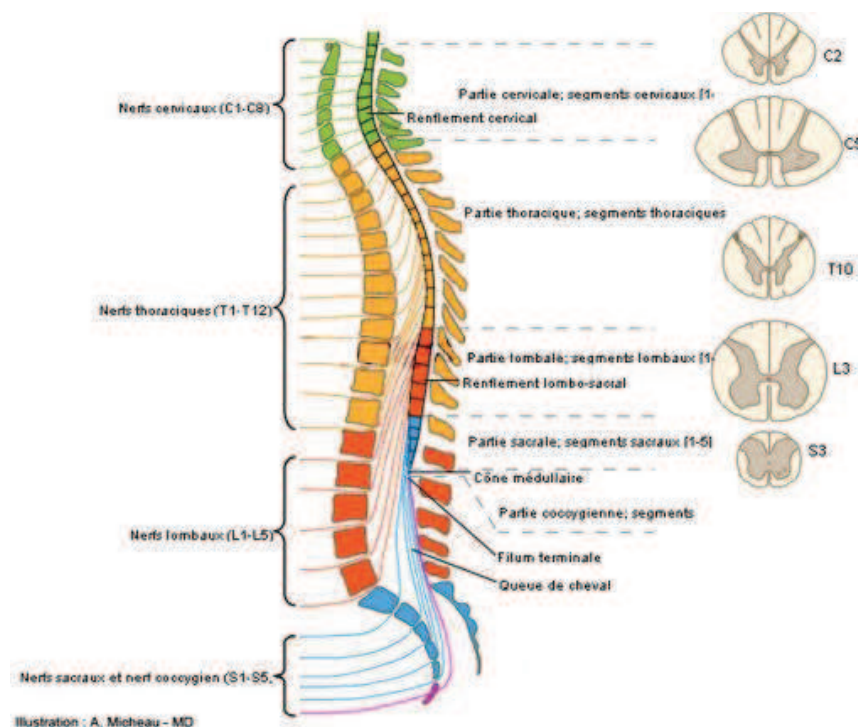


Figure 26 : Représentation schématique de l'organisation de la moelle épinière

Les neurones de la moelle épinière, ou neurones spinaux ont pour fonctions principales de relayer l'information sensitive cutanée vers le cerveau et de transmettre la volonté du mouvement par l'intermédiaire des motoneurones. Ces deux systèmes possèdent une localisation anatomique spécifique au sein de la moelle épinière. Les neurones sensitifs sont en effet concentrés au niveau dorsal alors que les neurones moteurs sont principalement confinés dans la partie ventrale de la moelle épinière (Brown, 1981). Comme dans d'autres régions du SNC, cette distribution cellulaire dans la moelle épinière dépend de deux systèmes de signalisation qui s'activent peu après l'induction neurale (Harland, 2000). Ils déterminent la position des types cellulaires le long des axes rostro-caudal et dorso-ventral par le biais de gradients moléculaires (Pituello, 1997).

La signalisation le long de l'axe rostro-caudal permet de subdiviser le SNC en prosencéphale, mésencéphale, rhombencéphale et moelle épinière (Lumsden et Krumlauf, 1996), alors que celle le long de l'axe dorso-ventral est plus impliquée dans la diversité des types cellulaires neuronaux. Les neurones moteurs de la corne ventrale de la moelle épinière se distinguent des neurones sensitifs localisés dans la corne dorsale. De la position des progéniteurs neuraux le long de ces deux axes va dépendre de nombreux aspects impliqués dans le développement des cellules neurales comme leur taux de prolifération, leurs périodes de différenciation ou les cibles des connexions axonales (Kummer, 2006).

3.2.2.1. Caudalisation du SNC et acquisition du profil spinal

Contrairement aux autres régions du SNC, la moelle épinière se développe sur une plus longue période au cours de laquelle ses progéniteurs neuraux disposés sur son axe rostro-caudal vont se spécialiser. Bien que les cellules neurales dont dérive la moelle épinière ont initialement un profil rostral, la moelle épinière est une structure caudale (Stern, 2001).

Plusieurs voies signalétiques sont impliquées dans l'acquisition de ce caractère caudal comme celle des FGFs (Cox et Hemmati-Brivanlou, 1995; Doniach, 1995; Storey *et al.*, 1998), des rétinoïdes (Blumberg *et al.*, 1997), des membres de la famille des TGF• tels que les BMPs, de la voie Wnt (Nordstrom *et al.*, 2002) ou de l'activité du mésoderme paraxial caudal (Bang *et al.*, 1999). Par exemple, le FGF8 agit en atténuant les signaux de la voie des BMP qui tendraient à induire la formation de l'épiderme (Pera *et al.*, 2003). L'opposition mutuelle des voies FGF et des acides rétinoïques permet de contrôler la segmentation du mésoderme et les différentes identités cellulaires le long de l'axe rostro-caudal en régulant l'activité des gènes Hox (Dasen et Jessell, 2009; Diez del Corral *et al.*, 2003; Diez del Corral et Storey, 2004). Ces facteurs de transcription, qui dépendent essentiellement des signaux de FGF dans la moelle épinière (Liu *et al.*, 2001), sont impliqués dans le contrôle des projections axonales motrices et l'organisation en colonne des motoneurones (Figure 27)

(Dasen *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré que l'inactivation des groupes de gènes Hox-C altérerait l'innervation des motoneurones avec leurs cibles musculaires au niveau des membres (Carpenter *et al.*, 1997; Dasen et Jessell, 2009; de la Cruz *et al.*, 1999; Tiret *et al.*, 1998).

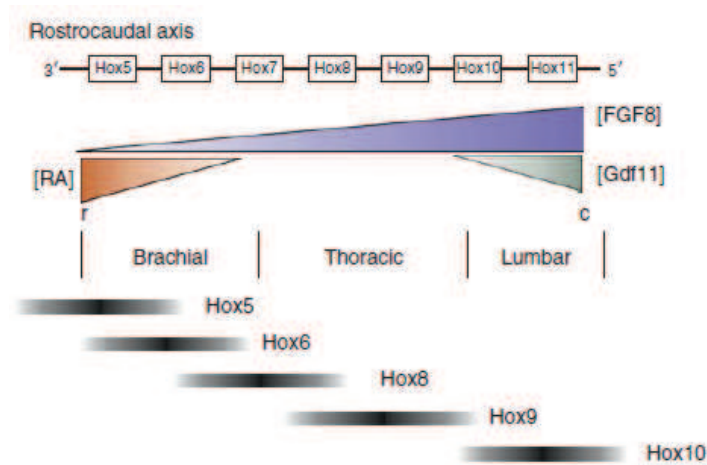


Figure 27 : Le long de l'axe rostrocaudal, le gradient de FGF induit l'expression des gènes Hox (Dasen et Jessell, 2009).

L'identité des progéniteurs neuraux ou les cibles que les motoneurones vont innervier dépend également de leur localisation spécifique sur l'axe dorso-ventral (Figure 28).

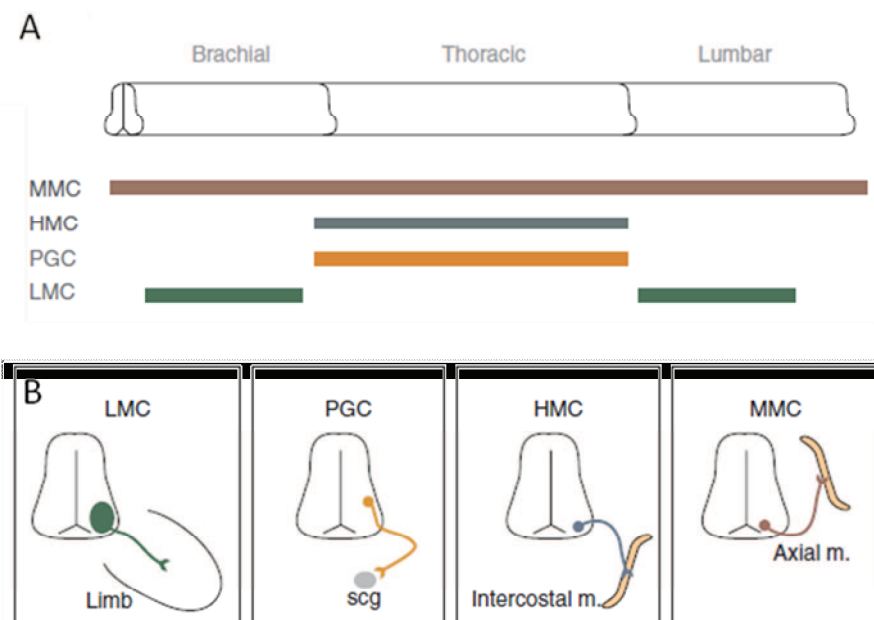


Figure 28 : Organisation en colonne des neurones moteurs le long de l'axe rostrocaudale. (A) on distingue la colonne motrice latérale (LMC) dont les motoneurones vont innervier les membres ; la colonne préganglionnaire (PGC) qui innervent la chaîne ganglionnaire sympathique, les neurones de la colonne motrice hypaxiale (HMC) innervent les muscles intercostaux et abdominaux, et les neurones de la colonne motrice médiane (MMC(m)) dont les axones se développent vers les muscles dorsaux axiaux. (B) Pattern de projection des motoneurones en fonction de leur appartenance à une catégorie de colonne (d'après (Dasen et Jessell, 2009)).

Leur répartition en colonne se divise en quatre classes majeures, chacune innervant une cible périphérique spécifique. Ainsi, on distingue la colonne motrice latérale (LMC) dont les motoneurones vont innerver les membres ; la colonne préganglionnaire (PGC) qui innerve la chaîne ganglionnaire sympathique, les neurones de la colonne motrice hypaxiale (HMC) innervent les muscles intercostaux et abdominaux (Gutman *et al.*, 1993; Prasad et Hollyday, 1991), et les neurones de la colonne motrice médiane (MMC(m)) dont les axones se développent vers les muscles dorsaux axiaux (Gutman *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 1998). Chacun de ces groupes de motoneurones peuvent être définis par l'expression des gènes Hox spécifiques (Dasen et Jessell, 2009).

3.2.2.2. Mécanisme de ventralisation du SNC

Le processus de régionalisation des précurseurs neuraux dans la partie ventrale du SNC implique également une coordination spatio-temporelle complexe de multiples facteurs appartenant à ces mêmes voies de signalisation. Dans un premier temps, l'intervention des voies Nodal et Hedgehog est nécessaire avec l'inhibition des BMP. Puis, l'activité Hedgehog est requise pour neutraliser l'effet dorsalisant du facteur de transcription Gli3. Les signaux provenant des FGFs semblent également déterminer les progéniteurs neuraux vers les positions les plus ventrales (Lupo *et al.*, 2006).

Il apparaît donc évident que le sonic Hedgehog (Shh) joue un rôle crucial dans l'induction du profil ventral des progéniteurs neuraux dans le tube neural. Le gène *Shh*, homologue du gène *hedgehog* de la drosophile, code pour une protéine de signalisation qui est sécrétée au niveau de la notochorde puis par la plaque neurale (Placzek, 1995).

Le gradient de Shh diffusé influence l'identité des progéniteurs neuraux du tube neural et est fortement impliqué dans l'acquisition des profils motoneurones et interneurones ventraux (Jessell, 2000; Roelink *et al.*, 1995; Shirasaki et Pfaff, 2002). Toutefois, les interneurones les plus dorsaux (v0 et v1) seront induits en parallèle par l'action de l'acide rétinoïque qui est synthétisé par l'enzyme RALDH2 provenant du mésoderme paraxial (Maden, 1999; Pierani *et al.*, 1999). Deux classes de protéines à homéodomaines permettent d'interpréter le gradient de Shh (Briscoe *et al.*, 2000). Shh inhibe les protéines de la classe I, constituées de Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3 et Pax6, selon sa concentration et induit l'expression des protéines de la classe II composée de Nkx6.1 et Nkx2.2 (Figure 29). Ainsi, les différentes concentrations de Shh génèrent cinq classes de neurones dans la moitié ventrale du tube neural : quatre catégories d'interneurones v0, v1, v2, v3 et les motoneurones (Figure 29).

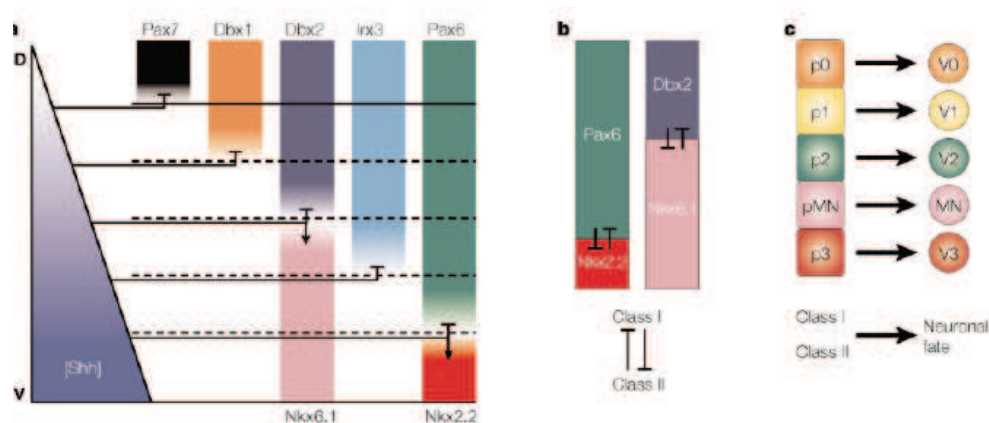


Figure 29 : Influence d'un gradient de Shh dans l'acquisition du profil ventral du système nerveux. Représentation des différentes étapes menant à l'acquisition du profil ventral par le Shh. (a) Le Shh inhibe les protéines à homéodomaines de classe I (Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3 et Pax6) alors qu'il induit l'expression des protéines de classe II (Nkx6.1 et Nkx2.2). (b) Ces deux classes se répriment entre elles. (c) Les différentes classes de progéniteurs neuronaux se répartissent dans la partie ventrale de la moelle épinière selon l'axe dorso-ventral (Jessell, 2000).

L'action combinée de Nkx6.1, Nkx2.2 et d'Irx3 permet de restreindre la génération des motoneurones à un seul domaine (pMN). L'activité de Nkx6.1 va induire l'expression en aval d'une autre protéine à homéodomaine, MNR2 qui régule sa propre expression et détermine la destinée du progéniteur vers une identité du motoneurone. MNR2 est également responsable de l'induction des facteurs de transcription plus spécifiques du motoneurone comme Lim3, Islet-1, Islet-2 ou Hb9 (Tanabe *et al.*, 1998).

3.2.2.3. Développement des motoneurones

Bien que tous les motoneurones spinaux proviennent du même domaine de l'axe dorso-ventral (pMN) (Briscoe *et al.*, 2000; Ericson *et al.*, 1996), ils acquièrent des identités différentes selon la position longitudinale de leur corps cellulaire dans la moelle épinière et selon leurs projections axonales vers la périphérie (Landmesser, 1978). Cet établissement en colonne est déterminé à la fois par les gènes Hox, précédemment décrit, et par l'expression de protéines à homéodomaines LIM spécifiques. Par ce processus, trois sous-types majeurs de motoneurones peuvent se distinguer. Islet-1 est requis pour la génération de tous les motoneurones dont la division médiane de la colonne motrice latérale (LMC(m)), dont les motoneurones vont prolonger leur axone vers les muscles ventraux (Pfaff *et al.*, 1996), alors que Lim1 caractérise sa division latérale (LMC(l)), dont les prolongements axonaux s'étendent quant à eux vers les muscles dorsaux ; enfin Lim3 caractérise la division médiane de la colonne motrice médiane (MMC(m)) dont les axones se développent vers les muscles axiaux (Figure 30) (Sharma *et al.*, 1998).

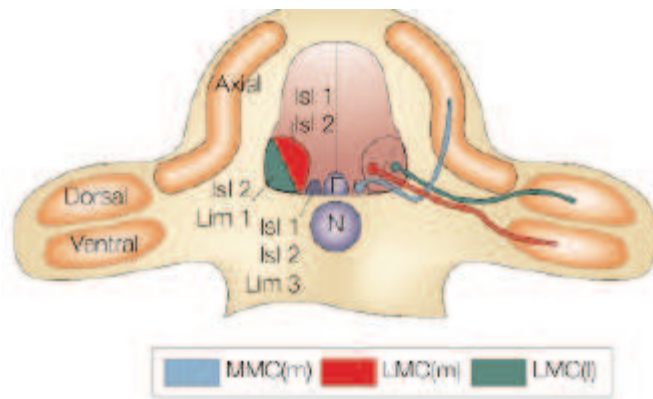


Figure 30 : Section transversale d'un embryon de poulet au niveau des membres antérieurs illustrant l'organisation spatiale en colonne des motoneurones dans le développement de la moelle épinière. Relation directe entre les cibles périphériques innervées par les projections axonales des motoneurones, l'expression des protéines à homéodomaines LIM, et la position des motoneurones sur l'axe dorso-ventral (Jessell, 2000).

L'identité motoneuronale est caractérisée par l'expression des transporteurs vésiculaires à l'acétylcholine (VACHT), qui induisent le rassemblement des AChR sous forme de petits groupes, ainsi que par les marqueurs HB9 et la choline acétyltransférase (ChAT).

Toutefois, l'étape déterminante qui permettra la maturation finale des motoneurones n'intervient qu'au moment de leur connexion avec leur cible musculaire. La mise en place de la jonction neuromusculaire, qui est par ailleurs déterminée par de nombreux signaux cellulaires entre ses deux composants, est une période critique dans le développement motoneuronal puisqu'elle est également décisive pour la survie des motoneurones (Witzemann, 2006).

3.3. La jonction neuromusculaire

La formation de la jonction neuromusculaire résulte de l'interaction des trois types cellulaires composants ce système : des motoneurones en croissance, des cellules musculaires en cours de différenciation et des cellules de Schwann (Couteaux et Pecot-Dechavassine, 1973). La juxtaposition de la partie terminale du motoneurone avec la structure post-synaptique complexe située à la surface du muscle requiert une coordination précise des nombreux signaux échangés entre ces différentes entités.

3.3.1. Composition

Au cours du développement les trois types cellulaires composant la JNM migrent sur une longue distance pour se retrouver et former la synapse. Les fibres musculaires dérivent des cellules du

mésoderme qui ont acquis leur propriété myogénique dans les somites (Brand-Saberi *et al.*, 1996). Ces précurseurs myogéniques vont ensuite migrer jusqu'au niveau de la formation de leur muscle, où elles vont se diviser dans un premier temps puis se différencier. L'expression des facteurs myogéniques complémentaires MyoD et Myf5 ainsi que de Noggin et Shh, antagonistes des facteurs prolifératifs BMP-4, Msx-1 et Notch va permettre aux précurseurs de s'orienter en myoblastes (Bailey *et al.*, 2001). Sous l'action indispensable de la myogenine, ces derniers vont pouvoir achever leur différenciation en fusionnant pour donner des myotubes multinucléés (Wright *et al.*, 1989).

Les cellules de Schwann, issues des crêtes neurales, sont impliquées dans de nombreux processus comme la protection et la survie des motoneurones aussi bien en tant qu'isolant qu'en tant que source de facteurs trophiques indispensables à leur maturation. En effet, en s'enroulant autour d'un même axone, elles vont former leur gaine de myéline. Celle-ci protège physiquement les axones tout en les isolant électriquement. Elle permet également d'accroître la vitesse de conduction de l'influx nerveux qui naît au niveau des nœuds de Ranvier, site de chevauchement de deux cellules de Schwann où se concentrent des canaux ioniques (Na⁺). Par la production de facteurs neurotrophiques comme le GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) ou le NT3, ces cellules sont essentielles pour la neuritogenèse et la survie des motoneurones avant le contact de ces derniers avec leurs cibles musculaires (Jessen et Mirsky, 1999; Martini, 2001). Au niveau de la jonction neuromusculaire, les cellules de Schwann semblent aider à maintenir la jonction serrée entre les éléments pré et post-synaptiques. Elles interviennent dans la stabilisation de la synapse en exprimant les molécules d'adhésion cellulaire N- et E-cadhérine (Colman, 1997). De plus, en recouvrant complètement la synapse entre la terminaison de l'axone du motoneurone et la fibre musculaire, les cellules de Schwann dites péri-synaptiques peuvent contrôler le recyclage et la dégradation des neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique et ainsi moduler l'efficacité de la transmission du signal (Castonguay et Robitaille, 2001; Robitaille, 1998).

Enfin, les motoneurones proviennent de la partie ventrale du tube neural et sont constituées d'un corps cellulaire, de dendrites qui sont de petits prolongements instables qui recueillent l'information et l'acheminent vers le corps de la cellule, et d'un long et unique prolongement, l'axone. Par l'intermédiaire de ce dernier qui sort de la moelle épinière et qui se ramifie pour établir plusieurs contacts synaptiques (plaque motrice) avec différentes fibres musculaires, les motoneurones ont pour fonction de relayer l'information motrice provenant du SNC pour produire les mouvements volontaires. Pour cela, leur partie terminale, est spécialisée dans la libération de neurotransmetteurs comme l'acétylcholine au niveau des synapses des jonctions neuromusculaires.

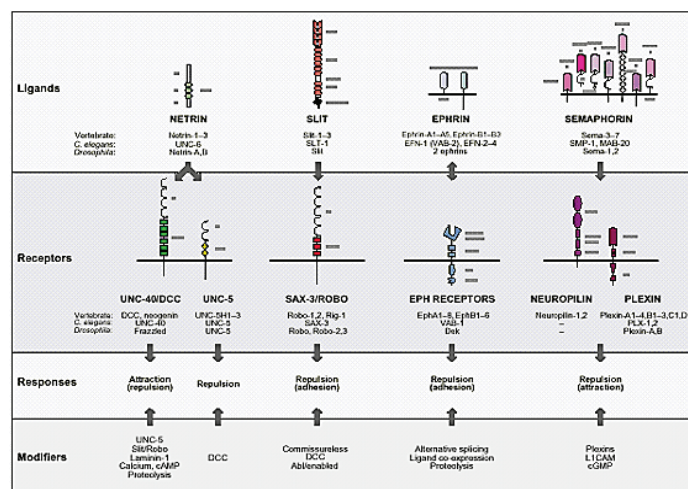
3.3.2. Etablissement de la jonction neuromusculaire

La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation des synapses reste encore aujourd'hui peu connue même si plusieurs étapes et molécules nécessaires au développement de la jonction neuromusculaire ont été mises en évidence (deLapeyriere et Henderson, 1997). En effet, en plus de la génération des trois composants cités précédemment, la formation des synapses requiert l'action de nombreuses molécules qui régissent de manière complexe la guidance des motoneurones jusqu'à leurs cibles, ainsi que l'induction des éléments pré- et post-synaptiques qui doivent se différencier pour acquérir une conformation particulière et permettre l'établissement de la jonction neuromusculaire.

3.3.2.1. Guidance axonale

Au cours du développement embryonnaire et postnatal du SNC, les prolongements des neuroblastes en croissance, s'étendent sur des distances considérables suivant souvent des chemins complexes pour établir une connexion fonctionnelle avec leurs cibles situées en dehors du SNC. Ce déplacement se fait grâce au mouvement actif de leur extrémité appelée cône de croissance. Cette structure transitoire est mobile et a pour fonction de percevoir l'environnement extracellulaire. En effet, les microfilaments d'actine et de myosine de ses filopodes peuvent s'allonger ou se rétracter selon leur rencontre avec différentes protéines extracellulaires.

Les familles de ligands et récepteurs les plus connues pour être fortement impliquées dans ces processus de migration neurale et de guidance axonale sont (Figure 31) : les ephrines (Flanagan et Vanderhaeghen, 1998; Palmer et Klein, 2003), les semaphorines / neuropilines (Raper, 2000), les netrines / DCC (Kennedy, 2000) et les Slits et leurs récepteurs Robo (Chedotal, 2007; Hammond *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2002).



De nombreuses études ont démontré le rôle chemoattracteur des netrines (de la Torre *et al.*, 1997), ou au contraire la fonction plus répulsive des Slits (Plump *et al.*, 2002) ou des ephrines (Nakagawa *et al.*, 2000). Toutefois, il a été montré que cette régulation de réponse des axones pouvait également dépendre du niveau intracellulaire d'AMP cyclique et du taux de Ca^{2+} (Jassen *et al.*, 2006; Nishiyama *et al.*, 2003; Zheng, 2000) ou encore d'autres molécules contenant des domaines riches en répétitions de leucine (LRR, Leucine-Rich Repeat) comme la famille de protéines transmembranaires Slitrk (Aruga et Mikoshiba, 2003; Chen *et al.*, 2006).

3.3.2.2. Accumulation des récepteurs à l'ACh à la membrane post-synaptique

Dès lors que les myoblastes commencent à fusionner en myotubes, ils vont exprimer les différentes sous-unités des récepteurs à l'acétylcholine (AChR) qui une fois traduites seront assemblées en pentamères et insérées au niveau de la membrane plasmique (Fambrough, 1979). Afin que le potentiel synaptique puisse être généré pour contracter les fibres musculaires, les AChR doivent être regroupés à une densité suffisamment élevée (environ 1000 par μm^{-2}). Cette différenciation post-synaptique semble induite par la partie terminale de l'axone des motoneurones à travers le relargage des molécules d'agrine (McMahan *et al.*, 1992) qui vont activer les récepteurs à activité tyrosine kinase spécifiques du muscle (MuSK, muscle skeletal receptor tyrosine kinase) présents à la surface des myotubes (DeChiara *et al.*, 1996). En s'associant à la rapsyne, ces récepteurs MuSK vont mener à la réorganisation des AChR et d'autres composants post-synaptiques sous forme de petits groupes (Figure 32) (Gautam *et al.*, 1996; Sanes et Lichtman, 2001; Witzemann, 2006).

La connexion du motoneurone avec le muscle au niveau de ces regroupements d'AChR est primordiale pour le maintien structurel de la jonction neuromusculaire. De ce contact dépend également la survie des motoneurones qui peuvent alors bénéficier certains facteurs trophiques indispensables comme des neurotrophines le CNTF ou le BDNF. Etant privés du stock limité de facteurs neurotrophiques, l'excès majoritaire de motoneurones généré au cours du développement va se rétracter et dégénérer (deLapeyriere et Henderson, 1997; Henderson, 1996). Une fois la jonction neuromusculaire correctement établie, la transmission de l'influx nerveux entre le motoneurone et le muscle devient possible grâce au relargage d'acétylcholine dans la fente synaptique. Ce neurotransmetteur va activer ses récepteurs AChR situés sur l'élément post-synaptique ce qui va mener à la dépolarisation de la membrane et générer un potentiel d'action qui va se propager le long de la fibre musculaire. L'augmentation du taux de calcium cytosolique résultant à la fois d'un influx à travers la membrane plasmique et de l'efflux du réticulum sarcoplasmique va permettre d'activer la contraction musculaire et inhiber la transcription d'AChR (Adams et Goldman, 1998; Huang *et al.*, 1994; Sanes et Lichtman, 1999)

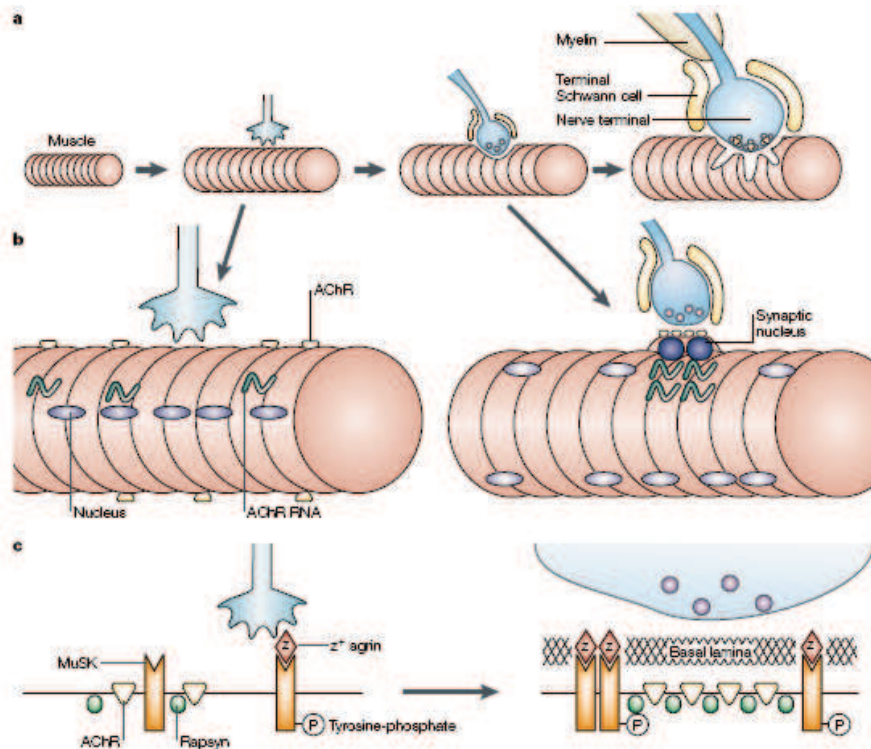


Figure 32 : Regroupement des AChR au cours de la formation de la jonction neuromusculaire. (a) Schéma chronologique représentant la mise en place de la JNM. (b) Les AChR sont déjà présents à la surface du myotube lors de l'approche du motoneurone mais de façon modérée et éparpillée. En revanche, ils sont majoritairement regroupés au niveau synaptique plus tard au cours du développement ce qui suggère leur redistribution. (c) L'agraine relâchée par la terminaison nerveuse se stabilise avec la lame basale de la fente synaptique. Elle active ensuite MuSK qui regroupe les AChR par l'intermédiaire de la rapsyne (Sanes et Lichtman, 2001).

L'identification des différentes voies aboutissant à l'établissement du tube neural ainsi que les multiples signaux permettant aux progéniteurs neuraux de se spécialiser en motoneurones ont été déterminants dans le développement de protocoles de différenciation des CSE en motoneurones.

3.3.2.3. Différenciation des CSEh en motoneurones

3.3.2.3.1. Induction neurale des CSEh

In vitro, plusieurs méthodes permettent d'induire les CSEh dans la voie neurale. Elles basent soit sur la formation d'EBs, soit sur la différenciation spontanée des CSE, ou sur l'utilisation de cellules nourricières. Elles aboutissent toutes à l'obtention de précurseurs neuraux organisés soit en neurosphères, soit en rosettes neurales qui ont la capacité de se différencier aussi bien en neurones qu'en cellules gliales (oligodendrocytes et astrocytes) (Carpenter *et al.*, 2001; Reubinoff *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

Initialement, le terme de neurosphère désigne des agrégats multicellulaires obtenus à partir de cellules souches neurales adultes ou fœtales qui sont cultivées *in vitro* en présence des facteurs mitogènes EGF et FGF2 (Reynolds *et al.*, 1992). Les rosettes neurales sont quant à elles constituées de cellules neuroépithéliales. Ces précurseurs neuraux qui ont adopté une structure radiaire se caractérisent par l'expression de marqueurs du neuroectoderme comme Nestin, Pax6 (Paired box gene 6), NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et Sox1 (sex determining region-Y-box1), le premier marqueur exprimé lors de la formation de la plaque et du tube neural (Pevny *et al.*, 1998). Malgré leurs aspects circulaires, les rosettes neurales n'expriment pas de marqueurs de régionalisation dorso-ventral. Leur équivalent *in vivo* se rapproche donc plus de la plaque neurale, structure dans laquelle elles ont été observées chez la souris (Elkabetz *et al.*, 2008), que du tube neural.

3.3.2.3.2. Détermination neurale et différenciation en motoneurones

Trois protocoles sont actuellement décrits pour induire la formation de rosettes neurales à partir de CSEh :

1. Le premier protocole décrivant l'obtention de rosettes neurales était basé sur la co-culture de CSEh avec des cellules stromales (Lee, 2007). L'expérience acquise à partir des études de co-cultures, mettant en relation les CSE murines avec des lignées de cellules stromales de la moelle osseuse comme PA6 ou MS5, et permettant de réaliser l'induction neurale plus efficacement et sans expression de marqueurs mésodermiques (Barberi *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 2000), a permis de développer ce même type de protocole sur les CSE humaines et d'augmenter ainsi la quantité de cellules neuroépithéliales (Hong *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007b; Perrier *et al.*, 2004; Tabar *et al.*, 2005). L'adhésion des CSE semble donc jouer un rôle essentiel dans leur spécification neurale. D'autres études utilisent des matrices constituées de protéines de la matrice extracellulaire comme la laminine pour favoriser l'induction neurale (Goetz *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2008).

2. L'équipe du Dr. Studer ainsi que notre laboratoire a démontré qu'il était possible d'induire plus rapidement et efficacement la transformation des CSE en rosettes neurales en privilégiant un support matrigel aux cellules nourricières et en inhibant la cascade des Smad, à l'origine de l'auto-renouvellement (Chambers *et al.*, 2009). Pour cela, les cellules sont à la fois traitées par Noggin, qui inhibe la voie des BMPs et dont les effets bénéfiques avait déjà été démontrés pour permettre une meilleure induction neurale (Itsykson *et al.*, 2005; Sonntag *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008), et par la molécule SB431542 qui inactive les voies Lefty/Activin/TGFβ.

3. Le troisième protocole permettant l'obtention de rosettes neurales se base sur la formation préalable de corps embryoides (EB). Lorsque les CSEh sont cultivées en suspension à forte densité, elles se regroupent entre elles sous forme d'agrégats sphériques pour former les EBs. Ces

structures de taille et de composition cellulaire variables se différencient spontanément vers les trois feuillets embryonnaires. Une fois placés sur un support adhérent en présence de mitogènes tels que le FGF2, ces EBs génèrent des précurseurs neuraux qui s'organisent en rosettes (Zhang *et al.*, 2001) (Figure 33).

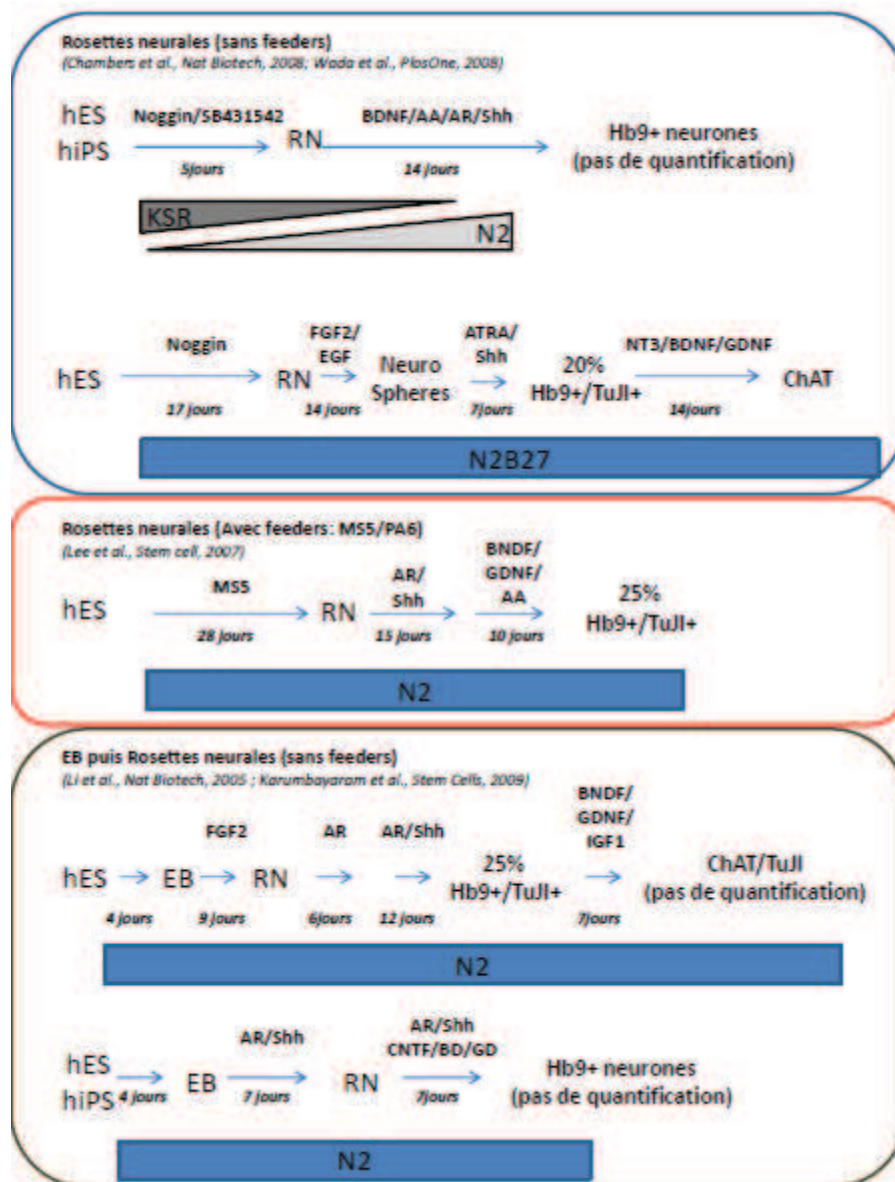


Figure 33 : Schéma illustrant les différents protocoles d'induction neurale des CSE et iPS humaines. Les précurseurs neuraux sous forme de rosettes neurales (RN) peuvent être obtenus en présence ou non de cellules nourricières, et par la formation ou non de corps embryoides.

Différents travaux ont permis de montrer que ces précurseurs neuraux pouvaient être spécifiés dans différents types neuronaux (Barberi *et al.*, 2003). Dans le cadre de l'obtention de motoneurones, plusieurs protocoles sont actuellement décrits (Figure 33). Tous se basent sur le traitement par l'acide

réinoïque et le Shh (Lee, 2007; Li, 2005; Chambers, 2009; Wada, 2009; Karumbayaram, 2009). L'ensemble de ces travaux décrit des protocoles permettant d'obtenir environ 25% de cellules motoneuronales caractérisées par l'expression du marqueur Hb9. Cependant, de part la limitation de la caractérisation de ces cultures, l'identité exacte de ces cellules, en particulier l'expression des gènes Hox, n'est pas bien documentée.

Au regard de ces expériences, il apparaît donc possible d'orienter l'identité régionale des précurseurs neuraux dérivés de CSEh, après exposition de ces derniers à des molécules de signalisation essentielles au développement de la région du cerveau souhaitée, et d'obtenir des sous-types de neurones spécifiques.

Problématique

Comme illustré dans l'introduction, les cellules souches pluripotentes humaines porteuses de mutation causale pour une pathologie humaine semblent représenter un nouvel outil cellulaire pertinent pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de cette affection. L'objectif général de ma thèse a consisté à participer à cette démonstration de preuve de concept en se focalisant sur la myotonie dystrophique de type I.

En collaboration avec l'équipe du Dr. Sermon (Bruxelles, Hôpital AZ-VUB), deux lignées de CSEh dérivées de blastocystes, issus de deux fécondations *in vitro* indépendantes, et porteuses de la mutation causale de la DM1, ont été obtenues au laboratoire. Une étude génomique a montré que ces deux lignées contiennent environ 1200 et 2000 répétitions CTG au niveau de la 3' non traduite du gène codant pour la DMPK (Mateizel *et al.*, 2006). Au laboratoire, l'équipe du Dr. Piétu a validé la pertinence de ces cellules en démontrant la présence de deux signaux moléculaires caractéristiques de la DM1, à savoir l'agrégation nucléaire de l'ARNm muté en association avec la séquestration de la protéine MBNL1 et le défaut d'épissage du récepteur à l'insuline. Ces anomalies ont été retrouvées au niveau des progénies neurales et mésodermes, qui correspondent à des populations cellulaires affectées chez le patient DM1. En vue de ces résultats, les objectifs de mon projet étaient doubles :

1/ En se basant sur une approche transcriptomique à large échelle, réalisée par le Dr. Piétu au laboratoire, identifier et valider des gènes spécifiquement modulés dans les cellules mutées par rapport à des cellules contrôles

2/ Comprendre leur implication physiopathologique dans la DM1

Dans la mesure, où l'ensemble des mécanismes conduisant aux affections du système nerveux dans la DM1 sont encore à ce jour peu compris, la première partie de ma thèse a porté sur l'étude de la modulation d'expression de gènes pouvant contribuer à ces symptômes. Plus particulièrement, mes recherches se sont focalisées sur des gènes appartenant à la famille SLITRK et aux récepteurs des Ephrines, qui de part leur rôle connu dans la guidance neuritique, apparaissaient comme des candidats intéressants. Je me suis principalement intéressé à leur potentielle contribution physiopathologique dans le développement du syndrome myotonique associé à la DM1, à savoir le défaut de communication entre le motoneurone et sa cible musculaire.

Parallèlement, l'analyse transcriptomique a permis d'identifier un facteur de transcription de la famille ZNF qui de façon intéressante présente une forte modulation d'expression génique, spécifiquement dans les cellules DM1, et ce quelque soit leur état de différenciation. Les mécanismes

moléculaires de la mutation DM1 sur cette altération génique ont été étudiés ainsi que la potentielle contribution physiopathologique de ce facteur de transcription.

Résultats

1. Identification de mécanismes moléculaires pouvant altérer le développement de la jonction neuromusculaire

1.1. Identification de modulations géniques

Afin d'identifier les gènes modulés en association avec l'expression de la mutation DM1, une approche transcriptomique a été réalisée par l'équipe dirigée par le Dr. Geneviève Piétu, en comparant l'expression des gènes entre les lignées normales (SA001 de Cellartis ; VUB01 de l'AZ-VUB) et mutée (VUB03 de l'AZ-VUB), à trois stades de différenciation : état non différencié, précurseurs neuraux (NCAM+) et précurseurs mésenchymateux. Les précurseurs neuraux ont été obtenus en utilisant un protocole basé sur la formation de rosettes neurales suivie par une sélection pour le marqueur NCAM, permettant de travailler avec une population homogène. La différenciation des CSEh dans une population homogène de précurseurs mésenchymateux a été réalisée en suivant le protocole développé par Mateizel (Mateizel *et al.*, 2008). L'étude transcriptomique, basée sur l'utilisation de puces à ADN Affymetrix (« Human Genome U133 plus 2.0 array »), a permis d'identifier 87 gènes dont l'expression est modulée d'au moins un facteur 2 (p value $<0,01$) entre les lignées de CSEh normales et la lignée porteuse de la mutation. Parmi ces gènes, celui codant pour la molécule SLITRK4 semblait présenter un intérêt pathologique dans la mesure où : 1. ce gène présentait une diminution de son expression uniquement au niveau des précurseurs neuraux 2. ce gène appartient à la famille des molécules SLITRK connues pour leur rôle dans la guidance neuritique.

1.2. Analyse fonctionnelle de la neuritogenèse dans des neurones issus de CSEh DM1

Afin d'étudier la présence d'un potentiel défaut fonctionnel de neuritogenèse dans le contexte de la DM1, les CSEh contrôles et mutées ont été différenciées en motoneurones. Cette population neuronale a été choisie car ce système nous permettait d'étudier les potentielles conséquences de l'expression de la mutation DM1 au sein de cette population tout en étendant notre étude à la synaptogenèse en observant la capacité de ces cellules à interagir avec leur cible musculaire.

La différenciation des CSEh en motoneurones a été réalisée en se basant sur les données de la littérature et d'une collaboration avec le Dr. H. Witcherle de l'université de Columbia à New York, qui a été le premier à décrire la différenciation des CSE murines en motoneurones (Wichterle *et al.*, 2002).

Schématiquement, ce protocole se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les CSEh sont orientées dans la voie neurale à l'aide d'une co-culture avec des cellules stromales MS5, ce qui permet d'obtenir des précurseurs neuraux organisés sous forme de rosettes neurales. Une fois isolés mécaniquement, ces derniers sont traités avec deux facteurs connus pour leurs rôles dans la différenciation cholinergique : l'acide rétinoïque, agent caudalisant, et le Sonic Hedgehog, agent

ventralisant. La maturation terminale des neurones cholinergiques est finalement induite, pendant une à deux semaines, en maintenant les cellules en présence de facteurs de survie tels que le BDNF, le GDNF, le CNTF, le NT3 et l'acide ascorbique. Parmi les neurones obtenus, 20 à 30% expriment le marqueur motoneuronal Hb9 après 40 jours de différenciation. Dix jours plus tard, 10% des cellules expriment le transporteur vésiculaire à l'acétylcholine (VACHT), signe de la maturation tardive des cellules cholinergiques. En parallèle, nous avons validé la pertinence physiopathologique de ce système cellulaire en identifiant dans nos cultures la présence d'agrégats ribonucléiques intranucléaires (*foci*) ainsi que l'anomalie d'épissage alternatif du gène codant pour la sous-unité 1 du récepteur au glutamate de type N-méthyl-D-aspartate (NMDAR1) (Jiang *et al.*, 2004), qui sont deux anomalies phénotypiques caractéristiques de la mutation DM1.

Des analyses immunohistologiques et de RT-PCR n'ont révélé aucune différence quant à la cinétique d'apparition et au niveau d'expression des différents marqueurs spécifiques de la voie cholinergique entre les cultures mutées et contrôles, ce qui suggère que l'expression de la mutation DM1 n'altère pas la différenciation cholinergique. En revanche, une augmentation statistiquement significative de l'arborisation neuritique est observée dans les cultures cholinergiques de deux lignées CSEh mutées par rapport aux cultures contrôles. Afin d'étudier si ce défaut neuritique pouvait avoir des conséquences sur la mise en place de contacts synaptiques, des co-cultures entre des motoneurons issus de CSEh et des myotubes primaires humains ont été développées. De façon surprenante, malgré une arborisation neuritique plus importante, le nombre de jonctions neuromusculaires observées est significativement plus faible dans les co-cultures de motoneurons dérivées de CSEh DM1 avec des myotubes, que lorsque les motoneurons sont dérivés de CSEh contrôles.

1.3. Effet de la sous-expression de SLITRK2 et SLITRK4 dans l'arborisation aberrante du réseau neuritique

Afin d'évaluer la possible corrélation entre les défauts neuritiques observés et le défaut d'expression du gène SLITRK4 identifié par l'analyse transcriptomique, l'expression de ce gène a été analysée durant le processus de différenciation cholinergique. Nous avons montré que cette sous-expression de SLITRK4 perdurait tout au long du processus de différenciation cholinergique de la lignée mutée VUB03, ainsi que dans une seconde lignée DM1 possédant plus de 2000 répétitions CTG (VUB24). En étendant cette analyse à d'autres gènes connus pour leur rôle dans le processus de guidance neuritique, nous avons identifié par RT-PCR un second membre de la famille, SLITRK2, dont l'expression est également fortement diminuée dans les lignées DM1. De façon intéressante, la diminution spécifique de ces deux gènes a également été observée dans des prélèvements de cerveaux fœtaux et adultes de patients DM1.

Notre hypothèse reliant l'altération de l'expression des membres de la famille SLITRK à une arborisation plus importante, se base sur les travaux du Dr. Aruga qui établit l'implication de ces protéines dans l'inhibition de la croissance neuritique (Aruga et Mikoshiba, 2003; Aruga *et al.*, 2003). La confirmation des conclusions apportées par Aruga sur le rôle *in vitro* de SLITRK2 et SLITRK4 dans la régulation de la croissance neuritique sur des cellules PC12, a été réalisée sur nos cultures aux stades de progéniteurs neuraux et neuronaux par deux approches antagonistes et complémentaires. Ainsi l'expression forcée de ces deux gènes dans des précurseurs neuronaux mutés aboutit à une diminution du réseau neuritique alors que l'extinction de l'expression de ces deux gènes par une approche lentivirale utilisant des ARNs anti-sens (small hairpin RNA ou shRNA) dans des cultures contrôles, résulte en une augmentation de l'arborisation neuritique. L'observation d'un tel défaut d'arborisation neuritique corrèle avec différentes observations qui ont été réalisées chez des patients DM1 et qui ont démontré une hyperprolifération neuritique de motoneurones spinaux (von Giesen *et al.*, 1994) ainsi que des anomalies structurales des terminaisons nerveuses au niveau des jonctions neuromusculaires (Pachter et Eberstein, 1986; Panaite *et al.*, 2008; Stranock et Davis, 1978). L'association de cette anomalie fonctionnelle aux défauts d'expression des gènes SLITRK, identifiés par une analyse transcriptomique, démontre également l'intérêt de ces approches à large échelle pour permettre de découvrir de nouveaux acteurs dans cette pathologie.

L'ensemble des résultats obtenus est détaillé dans un article actuellement en cours de révision, dont la version soumise suit.

1.4. Mise en évidence d'un nouveau défaut d'épissage alternatif dans la DM1 sur le récepteur à l'éphrine A5 (EPHA5)

Dans la mesure où la DM1 est une pathologie classiquement associée à des défauts d'épissage alternatif, nous avons recherché s'il existait des anomalies d'expression au niveau des différents exons des gènes codant pour SLITRK4 et SLITRK2, mais également pour des gènes codant pour d'autres molécules de guidance neuritique, tels que sémaphorine ou les récepteurs aux Ephrines.

De façon intéressante, alors qu'aucune différence n'a été observée pour l'ensemble des molécules testées, nous avons constaté une augmentation de l'expression de l'isoforme contenant l'exon9 du récepteur EphA5 dans les cultures cholinergiques mutées par rapport aux contrôles (Figure 1A et 1B). Cette anomalie est également retrouvée dans des biopsies de tissu cérébral de patients DM1 (Figure 1C) ainsi que dans des tissus cérébraux et spinaux de souris transgéniques DM1 présentant un nombre répétitions CTG supérieur à 1000 (Gomes-Pereira *et al.*, 2007). Dans ce système murin, nous avons observés une augmentation de l'exon 7 d'EphA5, homologue de l'exon 9 humain (Figure 1D). Dans le but d'associer ce défaut d'épissage alternatif à la mutation DM1, nous avons cloné l'exon 9

Mutant gene-carrying human pluripotent stem cells reveal an aberrant neuritogenesis and synaptogenesis in Myotonic Dystrophy Type 1

Antoine Marteyn¹, Yves Maury², Morgane Gauthier¹, Camille Lecuyer², Remi Vernet¹, Jérôme Denis¹, Denis Furling³, Marc Peschanski¹, Geneviève Pietu¹ and Cécile Martinat^{1*}

¹ INSERM/UEVE UMR 861 I-STEM AFM, 5 rue H. Desbruères 91030 Evry Cedex, France;

² CECS, I-STEM AFM, 5 rue H. Desbruères 91030 Evry Cedex, France;

³ UMR S 787/INSERM/UPMC-Institut de Myologie, 75634 Paris Cedex 13, France;

* corresponding author: cmartinat@istem.fr

Running Title : Defective neuritic outgrowth in DM1

Highlights : modelling pathogenesis, human pluripotent stem cells, Myotonic dystrophy type I, neuritic guidance molecules

Summary

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a multi systemic disorder affecting a variety of organs, including the central nervous system. By using neuronal progenies of human pluripotent stem cells carrying the causal DM1 mutation, we identified an early developmental defect in genes involved in the neuritic formation and establishment of neuromuscular connections. Differential gene expression profiling and quantitative RT-PCR revealed a specific decreased expression of two members of the *SLITRK* family in DM1 neural cells as well as in DM1 brain biopsies. Concordant to their known function as axonal guidance cues, neuritogenesis and synaptogenesis alteration were detected in DM1 motoneuron/muscle cell cocultures. Based on rescue and knockdown expression, our results indicated that the functional defects can be directly associated to the *SLITRK* misexpression. These neuropathological mechanisms may bear clinical significance as related to the functional alteration of neuromuscular connections associated to DM1.

Introduction

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most common inherited muscular dystrophy in adults, with muscle wasting and delayed relaxation after muscle contraction (myotonia) as prominent features. However, the disease is in fact pleiotropic and strongly affects a number of other functions and organs (Harper, 2001), out of which the central nervous system (CNS). Indeed, cognitive impairment and hypersomnolence have been clinically identified in DM1 patients (de Leon and Cisneros, 2008), while motor neurons axonopathy has been observed in post-mortem examination (Cros et al., 1988; Krishnan and Kiernan, 2006). Mental retardation in individuals with congenital DM1 has in addition been associated with defects in developmental processes (Dyken and Harper, 1973).

The molecular mechanisms that underlie the neuropathology in DM1 are still essentially unknown. The disease is due to the inherited unstable expansion of CTG triplet repeats located in the 3'-untranslated region of the dystrophin myotonia-protein kinase gene (*DMPK*). Although defects in the levels of the DMPK protein may by themselves contribute to some of the clinical features (Llagostera et al., 2007; Saba et al., 1999), the best accepted molecular model proposes that most symptoms would be associated to defects in other, totally unrelated genes, the processing of which is altered as a consequence of a trans-dominant misregulation of RNA processing (Cooper et al., 2009; Wheeler, 2008). DMPK transcripts exhibiting expanded CUG repeats accumulate in the cell nucleus instead of being exported to the cytoplasm. They form intranuclear inclusions (foci) by aggregating nuclear proteins among which some involved in RNA splicing and stabilization such as MBNL1. This sequestration of RNA-processing proteins in foci leads to a decrease in their activity and, consequently, to altered alternate splicing and abnormally regulated expression of a large number of genes, the outcome of which is the diversity of affected organs and clinical symptoms in DM1 (Cooper et al., 2009; Osborne et al., 2009; Ranum and Cooper, 2006). In the CNS, defects in alternate

splicing have thus been demonstrated, for instance, for the glutamate NMDA receptor 1 and the Tau protein (Jiang et al., 2004; Sergeant et al., 2001). Although these two genes –that have been identified through a candidate-gene approach and not by a large unguided screen- have important functional roles that may indeed explain some of the DM1 neuropathology, it is accepted that many others remain to be revealed in the CNS as in other tissues, and linked to precise functional alterations (Osborne et al., 2009).

We have undertaken the search for yet unrevealed molecular mechanisms underlying DM1 neuropathology by taking advantage of pluripotent stem cell lines that were derived from embryos characterized as gene-carriers for the disease during pre-implantation genetic diagnosis. These cells may self-renew indefinitely and can, therefore, be obtained in numbers as large as required. This was used here to implement a whole genome transcriptomic approach. They can also, because they are pluripotent, be differentiated into any cell lineage of interest. This was used here for functional studies of neurite-synaptogenesis. On this dual basis, we have revealed here a yet unknown neuropathological mechanism of DM1 that links gene defects in cells of the neural lineage to dysfunction in neuritic outgrowth and synaptogenesis,

Results

Two DM1-affected hES cells lines from independent couples were derived following pre-implantation genetic diagnosis, VUB03_DM1 and VUB24_DM1 (Mateizel et al., 2006), and made available to us. They carried a mutant *DMPK* gene that contained in the 3'UTR region around 1000 and 2000 CTG triplet repeats, respectively (Fig.S1). Two wild type stem cell lines were used as controls (VUB01, H9). There was no conspicuous alteration of cell growth or differentiation capacity for DM1 cells as compared to controls. *DMPK* mRNA was expressed in DM1-affected and control cells at similar levels, independently of their differentiation stage (Fig.S1).

Effects of CUGexp RNA on gene expression in DM1 human ES cells and their progenies

For differential transcriptomic analyses, VUB03_DM1 was compared to VUB01 and SA001 and results secondarily validated using quantitative RT-PCR in VUB24_DM1 and H9. Cells were either kept at the undifferentiated stage (hES) or differentiated into neural precursor cells (NPC) using the protocol by Perrier et al. (2004) up to the formation of so-called “neural rosettes”, followed by cell sorting using the pan neuronal surface marker NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, CD56) (Fig.S1). Mesodermal precursor cells (MPC) obtained by differentiation from the same stem cell lines (Mateizel et al., 2008) were used as an additional control of neural specificity of gene expression.

A global gene expression profiling was performed, using Affymetrix whole-genome DNA chips (Fig.S1). Principal Component Analysis showed very similar profiles of expression for the DM1 and the two wild-type cell lines at the same differentiation stage, indicating that effects of the DM1 mutation on gene expression were likely subtle (Fig.S1). All gene expression data are deposited in a public database (GEO Data Bank; accession number GSE7214). Observed changes in expression were validated using quantitative real-

time RT-PCR for 15 genes in VUB03_DM1 and VUB24_DM1 in at least one of the three cell types studied (Table 1). These genes, 8 downregulated and 7 overexpressed, are implicated in a large spectrum of cellular function ranging from transcription regulation to cell migration.

We focused our interest on *SLITRK4* because it was specifically downregulated in DM1 neural precursor cells. The SLITRK family of proteins has been shown to play a role in neuritic outgrowth (Aruga and Mikoshiba, 2003; Aruga et al., 2003) and this led us to undertake a comparative analysis of this phenomenon in DM1 and control stem cell neural progenies, in the search for a potential functional defect.

Functional analysis of neuritogenesis and synaptogenesis in DM1 neurons

We chose to differentiate DM1 stem cells into motoneurons as this offered us potentially access to a model of synaptogenesis in co-cultures with muscle cells. A differentiation protocol was adapted from existing ones (Martinat et al., 2006; Wichterle et al., 2002) combining Sonic Hedgehog (Shh) and retinoic acid (RA) (Fig.1A), analyzed using immunocytochemistry (Fig.1B) and quantitative RT-PCR (Fig.1D, Fig.S1). During neural induction, pluripotency markers were rapidly lost and neural rosette formation correlated with a peak of expression of *PAX6* (Fig.S1). *ISLET-1*, an early marker of postmitotic motoneurons, also peaked at that stage (Fig.1C). At later stages, following motoneuronal specification, approximately 30% of TuJ1+ neurons expressed the motoneuronal marker Hb9 while 15% already presented a more mature cholinergic phenotype, as revealed by the expression of the vesicular transporter of acetylcholine, VACHT (Fig.1B, C, D). No alteration of motoneuronal markers or other kinds of neurons was observed, either quantitatively or in their temporal appearance, in DM1 cells as compared to controls (Fig.1E, Fig.S1, Fig.S2).

Motoneurons derived from DM1 stem cell lines exhibited foci that co-localized the mutant DMPK RNA and the immunoreactive MBNL1 protein (Fig.1F). Altered splicing of

NMDAR1 was also observed, replicating the defect described in DM1 patients (Jiang et al., 2004) with increased expression of the isoform containing exon 5 (Fig.1G).

Comparative analysis of the neuritic fields was performed using the pan-neuronal MAP2 antibody. It revealed a statistically significant increase in the total MAP2 immunoreactive area in cultures of DM1 cells as compared to controls, in the absence of any significant difference in the numbers of neuronal cell bodies (Fig.2A and B). Similar results were also observed by using the pan-neuronal marker TuJ1 (data not shown).

Co-culture of the stem cell-derived neurons with human primary myotubes (Mu2bR3 cells) was then undertaken in order to determine the potential impact of this alteration of neuritic outgrowth on synaptogenesis. Neuromuscular junctions were quantified on the basis of the co-detection of the neuronal presynaptic marker TuJ1 and alpha bungarotoxin (BTX) that labels postsynaptic aggregation of acetylcholine receptors (Fig.2C). Results were paradoxical as the significantly larger neuritic network in DM1 cultures was associated with a very significant 5-10 fold decrease in the number of neuromuscular contacts as compared to controls (Fig.2D). DM1 cells were thus altogether characterized by a profuse neuritogenesis associated with a major loss of ability at forming neuromuscular connections.

Association of the *SLITRK* genetic defect and abnormal neuritogenesis in DM1

Altogether, gene expression and functional comparative analyses only provided us with circumstantial evidence for an association between *SLITRK4* down regulation and alteration in neurite outgrowth and synaptogenesis in DM1 cell cultures. Using quantitative PCR, we first screened systematically DM1 cells for expression of other genes that may be involved in axonal guidance (Chen and Cheng, 2009; Guan and Rao, 2003). This involved the 6 members of the *SLITRK* gene family, 5 ephrin ligands and receptors, Robo1, 3 semaphorins, DCC, neurogenin and neuropilin. This analysis confirmed the down expression of *SLITRK4*

and revealed only the misregulation of the closely related *SLITRK2* (Fig.3A, F, G) whereas no other tested gene was altered (Fig.3A). As *SLITRK2* and *SLITRK4* are located in the same region Xq27 of the X chromosome, it was checked that other genes located in the same portion were not similarly downregulated (Fig.3B-E). Chromosomal integrity was also controlled by CGH array (data not shown).

The genuine association of a decreased expression of *SLITRK2* and *SLITRK4* with myotonic dystrophy type 1 was validated by a similar observation made using quantitative RT-PCR in brain tissue samples from foetal and adult patients (Fig.3H). Again, no alteration was found of any of the other screened axonal guidance genes. Disrupted splicing by *MBNL1* does not, in contrast, seem involved in the defective expression of the two *SLITRK* genes, as transfection of DM1 and control cells with siRNA knocking down specifically *MBNL1* did not significantly change their expression (data not shown).

Final demonstration of the association of defects in *SLITRK2* and *SLITRK4* expression with functional alteration in neuritogenesis was then sought in DM1 cells using complementary functional genomics approaches. First, rescue of the functional defect was assayed by transitory plasmid nucleofection (Amaxa technology) with *SLITRK2* and *SLITRK4* constructs. The majority of the cells in the culture dish were transiently transfected and the two genes restored neuritic length down to control levels 1 week after transfection (Fig.4A and 4B). Expression of each of the genes independently was as effective as their combination (Fig.4B, Fig.S4). Conversely, stable knockdown of *SLITRK2* and *SLITRK4* in neurons derived from wild-type stem cell lines, using shRNA-recombinant lentiviral vectors, induced a 2-3 fold increase in neuritic length as compared to control cells treated with a GFP shRNA (Fig.5A and 5B). It should be mentioned, however, that in these latter experiments the specificity of the knock down was not complete as each construct affected several *SLITRK* genes (Fig.S4).

Discussion

The main result of the present study is the identification of a yet unknown neuropathological functional defect in DM1 that affects neuritogenesis and synaptogenesis at an early developmental stage. We have been able to demonstrate that this functional defect is directly associated to the abnormally low expression of two genes of the SLITRK family that was identified by screening human pluripotent stem cells from embryos that carried the DM1 mutation.

There is extensive evidence for central nervous system involvement in DM1, including patterns of psychological dysfunction, mental retardation, excessive daytime sleepiness, and neuropathological abnormalities (Abe et al., 1994; Damian et al., 2001; de Leon and Cisneros, 2008; Delaporte, 1998; Meola et al., 2003; Modoni et al., 2004; Park and Radtke, 1995; Sistiaga et al.; Turnpenny et al., 1994). Potential defects in neuritogenesis and synaptogenesis have been additionally suggested, and the protein DMPK was postulated early to participate to the formation and the signal transmission at the neuromuscular junction (van der Ven et al., 1993). Although this hypothesis has not been further substantiated, motoneuronal pathological defects have indeed been revealed in DM1. Ribonuclear aggregates of mutated DMPK RNA have been observed in patients' spinal motoneurons (Wheeler et al., 2007). At the level of neuro-muscular junctions, synaptic hyperproliferation (Nagao et al., 2003), demyelinated nerve fibers (Panaite et al., 2008) as well as abnormal shape and structure of motor nerve terminals (Pachter and Eberstein, 1986; Panaite et al., 2008; Stranock and Davis, 1978) have been described in DM1 patients and animal models. Concordant with these observations, our results also suggest that functional defects in neuritogenesis and synaptogenesis at the neuromuscular junction may be associated to DM1 at a very early developmental stage.

What can be the long-term biological and clinical consequences of the functional defects observed here *in vitro* and at a very early differential stage, is but a matter of

speculation. A major disruption of the formation and maintenance of neuro-muscular synapses altogether is unlikely, as this would have dramatic clinical consequences that are not observed in patients. Although we cannot exclude that the dramatic phenotype observed in our cultures might not be due to the *in vitro* conditions, these observations are concordant with the ones described in DM1 patients (de Leon and Cisneros, 2008). Unfortunately, the molecular basis of the defect that affects specifically two members of the SLITRK protein family does not directly provide much help, as data concerning these proteins are scarce. In keeping with our results, other members of the SLITRK family have been recently implicated in other neurologic dysfunctions. *SLITRK1* may be involved in the obsessive-compulsive disorder, trichotillomania (Zuchner et al., 2006) as well as in Gilles de la Tourette syndrome (Katayama et al., 2008; O'Rourke et al., 2009). *SLITRK6* could play a role in the sensory neural development of the inner ear, and its misexpression may provoke defects in coordination and balance (Katayama et al., 2009). Directly relevant to our results was the original demonstration that transient expression of mouse Slitrk2 and 4 in rodent PC12 pheochromocytoma cells and Neuro2a neuroblastoma cells resulted in a strong inhibition of neuritic outgrowth (Aruga and Mikoshiba, 2003).

Most interestingly, SLITRK proteins share functional characteristics with the Slit/Robo family which has been extensively studied. These proteins are indeed structurally related transmembrane proteins with an extracellular domain that contains two conserved leucine-rich repeat (LRR) highly similar to those in the Slit family (Aruga and Mikoshiba, 2003; Aruga et al., 2003). Proteins with LRR domain seem to play a key role in neural development by modulating neurite outgrowth (Chen et al., 2006). Similar to other families of proteins involved in axonal guidance and synaptic site recognition such as Ephrins, Netrins and Semaphorins, Slit/Robo proteins are responsible for the fine tuning of pre- and post-synaptic partners. Thus, studies demonstrate that Slit/Robo signaling play a role in the

arborization and synaptogenesis of mammalian sensory neurons (Wang et al., 1999) as in zebrafish retinal ganglion cell (Campbell et al., 2007). Although this hypothesis is essentially supported by extrapolation, a similar role of SLITRK proteins may well correspond to the observations made of their defect in DM1 cells, as the association of a profuse neuritogenesis and loss of synaptogenesis may reveal a discrete alteration in recognition signals between the two partners of the synapse.

Whereas the current accepted pathological model of DM1 holds that manifestations result from alteration of proteins involved in pre-mRNA splicing, recent studies showed that DM1 pathological mechanisms may not all be explained directly by such mechanisms. Osborne et al., suggested that (CUG) expansion RNA might interfere at both transcriptional and post-transcriptional level by characterizing affected genes in a DM1 transgenic mouse model expressing 250 CUG repeats in 3' UTR of the skeletal actin mRNA (Osborne et al., 2009). The authors postulated that poly(CUG) may induce post-transcriptional silencing of genes containing CAG repeats, such as *Med12* that encodes the transcriptional co-activator Mediator, mutations of which have otherwise been associated with infantile hypotonia. Parallel alteration of pre-mRNA levels and expression of some genes also pointed to an effect of the CUG expansion on transcription. These observations were concordant with the induction of the transcription factor Nkx2.5 observed in DM1 skeletal muscle (Yadava et al., 2008). The exact mechanism of this effect is still unclear and could be attributed, at least partially, to the leaching of transcription factors from chromatin and their sequestration by the mutant DMPK RNA (Ebralidze et al., 2004). Although we cannot exclude that the down expression of the SLITRK members observed in DM1 could be related to a defect in either alternate splice or stability, we did not observe any modulation of their expression by extinguishing the level of MBNL1, one of the splice factor trapped by the mutation, using

siRNA in control cells suggesting that these misregulations might, at least, not controlled by a MBNL1 dependent splice.

In the search for molecular actors of DM1 that have remained beyond reach of the past hypothesis-driven studies, we have turned to a resource-driven approach in an attempt to fish out differentially expressed genes in cells carrying the DM1 gene by comparison with wild-type controls. We have based our approach upon human embryonic stem cell lines (hES) derived following pre-implantation genetic diagnosis (PGD) for DM1 (Mateizel et al., 2006). Human ES cell lines indeed provide the dual advantage of the production of an unlimited amount of cells, due to their indefinite capacity at self-renewal, and of the ability to differentiate into homogenous cell populations of discrete phenotypes (Fenno et al., 2008). PGD permits, as a complement for such studies, to characterize precisely the genomic defect of the cell lines (Mateizel et al., 2006). The use of PGD-derived embryonic stem cell lines has recently revealed instrumental for the study of the fragile X molecular mechanisms (Eiges et al., 2007). The recent demonstration that patient's skin fibroblasts can be reprogrammed to a pluripotent state by inducing a "forced" expression of certain genes implicated in the pluripotency, offers new opportunities to generate stem cells recapitulating more complex genetic disorders (iPS, induced Pluripotent Stem cells), such as the amyotrophy spinal lateral or the familial dysautonomia (Dimos et al., 2008; Lee et al., 2009). Concordant with these studies, our results contribute to demonstrate the value of human pluripotent stem cells as appropriate model to study events involved in the pathogenesis.

Materials and Methods

Human ES cell culture

Mutants hES cell line (VUB03_DM, XX, passages p70-p90; and VUB24_DM; XX, passages p30-40, derived in AZ-VUB) and wild type human ES cells (H9, XX, passages 40–60; WiCell Research Institute; and VUB01, XY, passages p80-90) were maintained on a layer of mitotically inactivated STO feeders (ATCC) and were cultured in as previously described (Lefort et al., 2008).

Cholinergic Differentiation

hES cells were plated on mitotically inactivated murine bone marrow-derived stromal feeder cells MS5 at round 1.10^3 cells / cm² in serum replacement medium containing DMEM / F12 supplemented with 15% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, and 0.55 mM 2-mercaptoethanol and 1% penicillin/streptomycin (all from Invitrogen). After 16 days in these conditions, medium was switched to N2 medium that consisted of DMEM / F12 supplemented with insulin (25 ng/ml), transferrin (50 ng/ml), putrescine (100 μ M), selenium chloride (30 nM), and progesterone (20 nM) (all from Sigma–Aldrich) and containing growth factors: Sonic Hedgehog (Shh) (300 ng/ml), BDNF (20 ng/ml) (R & D Systems), retinoic acid (RA) (30 ng/ml) and laminin (Sigma–Aldrich). At 24 days of differentiation, neural rosettes structures are mechanically harvested and plated on poly-ornithine / laminin-coated culture dishes with the same medium (passage 1). At 35 days in vitro, cholinergic precursors were exposed to collagenase (100 ng/ml) for 15 minutes at 37°C, and plated onto poly-ornithine / laminin-coated culture dishes in the presence of Shh (30 ng/ml), BDNF (20 ng/ml), RA (3 ng/ml) and laminin (passage 2). One week later, inductive signals are withdrawn and replaced by 20 ng/ml BDNF, 20 ng/ml GDNF, 10 ng/ml CNTF, 10

ng/ml NT-3 and 200 mM Ascorbic acid. All along the process, medium was changed every 2–3 days.

For co-culture with muscular cells, neuronal cells are harvested at 25 days, plated on differentiated human Mu2bR3 (kindly gift by Bioalternatives®) and maintained for 13 days in a mix medium between neural and muscular mediums as previously described (Braun et al., 1996).

Immunocytochemistry and *in situ* hybridization

Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde and blocked in phosphate buffer solution (PBS) supplemented with 0,1% Triton X-100 and 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking buffer. Antibodies comprised rabbit anti Neuronal Class III β -tubulin (TujI) (Covance, 1/500), rabbit anti Microtubule Associated Protein 2 (MAP2) (Covance, 1/500), mouse anti Islet-1 (Isl-1) (DSHB, 1/100), mouse anti Hb9 (DSHB, 1/100), guinea pig anti Vesicular Acetylcholine Transporter VACht (Millipore, 1/500), mouse anti Mbnl1 (3A4) (Santa cruz biotechnology, 1/100), Alexa⁴⁸⁸ α -bungarotoxin (α -BTX) (Invitrogen, 1/500). Cells were stained with the species-adaptated secondary antibody conjugated either with FITC or Cy3 (1/1000) (Jackson ImmunoResearch) and the nuclei were visualised with 4,6 L-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1/10000). Images were captured using a fluorescent Zeiss microscope.

In situ hybridization was performed to detect the accumulation of pathological RNA by using Alexa555 labeled (CAG)¹⁰ oligonucleotidic probe (Operon®). Images were captured using a fluorescent Zeiss microscope.

RNA extraction, Real Time RT-PCR

Total RNA from cells was extracted by “RNeasy Mini Protocol” (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Reverse transcription was performed with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). To study relative gene expression, real-

time PCR were performed with Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on a Chromo4 Real-Time system (Bio-Rad) whereas the quantification of NMDAR1 splice defects were detected by real-time PCR performed with TaqMan technologies on a ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). The primer and the probes used for detection were: NMDAR1 ex.5 sense: 5'-CGACCAACTGTCCTATGACAACA-3', probe: 5'-CGCGGACCCAAGG-3', antisens: 5'-GGTCAAACCTGCAGCACCTTCT-3', NMDAR1 total sense: 5'-TGGAGGAGCGTGAGTCCAA-3', probe: 5'-CAGAGAAGGTGCTGCAG-3', antisens: 5'-AGGGCCGTCACGTTCTTG-3'. The primers used in this study are summarized in supplementary Table 1.

Plasmids

SLITRK2 cDNA was obtained by using a *SLITRK2* antisense primer: 5'-CCAACAGTTCGGAGCAGCATC-3' during the reverse transcription of wild type MSC RNA. Then, the CDS of *Slitrk2* was amplified by PCR using the primers described in supplementary table 1. The CDS of *SLITRK4* was amplified by PCR from the Imagenes-bio cDNA Clone Sequencing HU4_p940D12182D using the primers described in supplementary table 1. PCR products were cloned using the "Zero blunt TOPO PCR cloning kit" (Invitrogen). Insertion into the pcDNA3 plasmid was performed using BamHI / EcoRV restriction sites. The insert was purified using "NucleoSpin Extract II" kit (Macherey-Nagel) and ligation by using Quick Ligation™ Kit procedure (Biolabs; Ozyme). All plasmids were produced following NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) protocol.

Transitory plasmid nucleofection

Amata nucleofection was performed by using the Rat Neural Stem Cell Nucleofector Kit (Lonza) according to the manufacturer's protocol (Amata). Briefly, VUB03_DM and H9 neural rosettes from passage 1 (24 div) were collected and were resuspended at 4.10^6 cells per

conditions in 100µl of nucleofection solution supplemented, and containing 4 µg of plasmid (GFP, SLITRK2-pcDNA4, SLITRK4-pcDNA3). Once, the nucleofection process performed, cells were plated on 4 poly-ornithine / laminin-coated dishes of Lab-Tek chamber slide 8 wells (Nunc) with N2 medium supplemented with Shh (300 ng/ml), BDNF (20 ng/ml), RA (30 ng/ml) and laminin (100 ng/ml). Medium was changed every day before RNA extraction 3 days after and fixation at round 10 days later.

DM1 tissues

All adult myotubes and myoblastes were obtained from quadriceps muscles biopsies (kindly gift by Dr. D. Furling). The fetal brains RNA (kindly gift by Dr. G. Gourdon) were derived from fetuses aged from 12 to 25 amenorrhea weeks. DM1 samples were affected to different degrees (97-1500 CTG repeats). Post-mortem brains RNA (kindly gift by Dr.A. Delacourte) resulted from frontal cortex biopsies of six patients (three DM1 (DS61; GOS4; BAS3) and three wild type (BA72; D165B; HO60)).

Sh RNA SLITRK lentiviral transduction

Lentiviral Sh RNA Slitrks's transduction was performed with: "NM_173078 / SLIT and NTRK-like family, member 4 / MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles / clone TRCN0000078623 / NM_173078.2-3203s1c1", "NM_032539 / SLIT and NTRK-like family, member 2 / MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles / clone TRCN0000153670 / NM_032539.2-4826s1c1", and "MISSION® Control Transduction Particles" (Sigma-Aldrich).

Briefly, VUB01 and VUB03_DM neural rosettes from passage 1 (24 div) were collected and were resuspended at 8.10^5 cells per conditions. The lentiviral infection was realised at an MOI of 1 in 40µl of lentiviral supernatant during 30 minutes at room temperature. Then, cells were plated on 4 poly-ornithine / laminin-coated dishes of Lab-Tek hamber slide 8 wells with N2 medium supplemented with Shh (300 ng/ml), BDNF (20

ng/ml), RA (30 ng/ml) and laminin. Medium was changed every day before RNA extraction 3 days after and fixation at round 10 days later.

Array Scan analysis

Outgrowth of the neuritic network during differentiation, after transitory plasmid nucleofection, or after Sh RNA Slitrks lentiviral transduction was analysed by the ArrayScan VTI HCS Reader (Cellomics). Data like number of neural cells, expansion area, length, intensity, or number of neurites were examined by using Cell selecting software (Cellomics).

Statistical analysis

All the statistical analysis were performed by using JMP7 software. All the data represent means \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed by ANOVA with Student t post-hoc test.

Acknowledgements:

We thank Gillian Butler-Brown and Xavier Nissan for helpful discussions, Genevieve Gourdon INSERM U781, Paris, France for performing the CTG repeat analysis and Karen Sermon UZ Brussels, Belgium for providing DM1 and control hES. This work was supported by the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Association Française contre les Myopathies (AFM), MediCen (IngeCell program) and Genopole. AM had a fellowship from the Region Ile de France.

References

- Abe, K., Fujimura, H., Toyooka, K., Yorifuji, S., Nishikawa, Y., Hazama, T., and Yanagihara, T. (1994). Involvement of the central nervous system in myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* 127, 179-185.
- Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2003). Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 24, 117-129.
- Aruga, J., Yokota, N., and Mikoshiba, K. (2003). Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene* 315, 87-94.
- Braun, S., Croizat, B., Lagrange, M. C., Warter, J. M., and Poindron, P. (1996). Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures. *J Neurol Sci* 136, 17-23.
- Campbell, D. S., Stringham, S. A., Timm, A., Xiao, T., Law, M. Y., Baier, H., Nonet, M. L., and Chien, C. B. (2007). Slit1a inhibits retinal ganglion cell arborization and synaptogenesis via Robo2-dependent and -independent pathways. *Neuron* 55, 231-245.
- Chen, S. Y., and Cheng, H. J. (2009). Functions of axon guidance molecules in synapse formation. *Curr Opin Neurobiol* 19, 471-478.
- Chen, Y., Aulia, S., Li, L., and Tang, B. L. (2006). AMIGO and friends: an emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. *Brain Res Rev* 51, 265-274.
- Cooper, T. A., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2009). RNA and disease. *Cell* 136, 777-793.
- Cros, D., Hamden, P., Pouget, J., Pellissier, J. F., Gastaut, J. L., and Serratrice, G. (1988). Peripheral neuropathy in myotonic dystrophy: a nerve biopsy study. *Ann Neurol* 23, 470-476.
- Damian, M. S., Gerlach, A., Schmidt, F., Lehmann, E., and Reichmann, H. (2001). Modafinil for excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy. *Neurology* 56, 794-796.
- de Leon, M. B., and Cisneros, B. (2008). Myotonic dystrophy 1 in the nervous system: from the clinic to molecular mechanisms. *J Neurosci Res* 86, 18-26.
- Delaporte, C. (1998). Personality patterns in patients with myotonic dystrophy. *Arch Neurol* 55, 635-640.
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221.
- Dyken, P. R., and Harper, P. S. (1973). Congenital dystrophia myotonica. *Neurology* 23, 465-473.
- Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidse, K., and Junghans, R. P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 383-387.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., and Ben-Yosef, D. (2007). Developmental Study of Fragile X Syndrome Using Human Embryonic Stem Cells Derived from Preimplantation Genetically Diagnosed Embryos. *Cell Stem Cell* 1, 568-577.
- Fenno, L., Ptaszek, L., and Cowan, C. (2008). Human embryonic stem cells: emerging technologies and practical applications. *Curr Opin Genet Dev*, 324-329.
- Guan, K. L., and Rao, Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4, 941-956.

Harper, P. S. (2001). Myotonic Dystrophy. 37.

Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., and Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 13, 3079-3088.

Katayama, K., Yamada, K., Ornathanalai, V. G., Inoue, T., Ota, M., Murphy, N. P., and Aruga, J. (2008). Slitrk1-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities. *Mol Psychiatry* 15, 177-184.

Katayama, K., Zine, A., Ota, M., Matsumoto, Y., Inoue, T., Fritsch, B., and Aruga, J. (2009). Disorganized innervation and neuronal loss in the inner ear of Slitrk6-deficient mice. *PLoS One* 4, e7786.

Krishnan, A. V., and Kiernan, M. C. (2006). Axonal function and activity-dependent excitability changes in myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* 33, 627-636.

Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. A., Ganat, Y. M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., *et al.* (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402-406.

Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A. L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* 26, 1364-1366.

Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T. P., Kondo, R., Reddy, S., Dillmann, W. H., Palacin, M., *et al.* (2007). Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS ONE* 2, e1134.

Martinat, C., Bacci, J. J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W. B., Newman, A. H., Cha, J. H., Gether, U., Wang, H., and Abeliovich, A. (2006). Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2874-2879.

Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 21, 503-511.

Meola, G., Sansone, V., Perani, D., Scarone, S., Cappa, S., Dragoni, C., Cattaneo, E., Cotelli, M., Gobbo, C., Fazio, F., *et al.* (2003). Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2). *Neuromuscul Disord* 13, 813-821.

Modoni, A., Silvestri, G., Pomponi, M. G., Mangiola, F., Tonali, P. A., and Marra, C. (2004). Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol* 61, 1943-1947.

Nagao, M., Kato, S., Hayashi, H., and Misawa, H. (2003). Hyperproliferation of synapses on spinal motor neurons of Duchenne muscular dystrophy and myotonic dystrophy patients. *Acta Neuropathol* 106, 557-560.

O'Rourke, J. A., Scharf, J. M., Yu, D., and Pauls, D. L. (2009). The genetics of Tourette syndrome: a review. *J Psychosom Res* 67, 533-545.

Osborne, R. J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J. R., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*.

Pachter, B. R., and Eberstein, A. (1986). Motor endplate involvement in the extraocular muscles of the myotonic rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224, 325-329.

Panaite, P. A., Gantelet, E., Kraftsik, R., Gourdon, G., Kuntzer, T., and Barakat-Walter, I. (2008). Myotonic dystrophy transgenic mice exhibit pathologic abnormalities in diaphragm neuromuscular junctions and phrenic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 763-772.

- Park, J. D., and Radtke, R. A. (1995). Hypersomnolence in myotonic dystrophy: demonstration of sleep onset REM sleep. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58, 512-513.
- Ranum, L. P., and Cooper, T. A. (2006). RNA-Mediated Neuromuscular Disorders. *Annu Rev Neurosci*.
- Saba, S., Vanderbrink, B. A., Luciano, B., Aronovitz, M. J., Berul, C. I., Reddy, S., Housman, D., Mendelsohn, M. E., Estes, N. A., 3rd, and Wang, P. J. (1999). Localization of the sites of conduction abnormalities in a mouse model of myotonic dystrophy. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10, 1214-1220.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. A., Wattez, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10, 2143-2155.
- Sistiaga, A., Urreta, I., Jodar, M., Cobo, A. M., Emparanza, J., Otaegui, D., Poza, J. J., Merino, J. J., Imaz, H., Marti-Masso, J. F., and Lopez de Munain, A. Cognitive/personality pattern and triplet expansion size in adult myotonic dystrophy type 1 (DM1): CTG repeats, cognition and personality in DM1. *Psychol Med* 40, 487-495.
- Stranock, S. D., and Davis, J. N. (1978). Ultrastructure of the muscle spindle in dystrophia myotonica. II. The sensory and motor nerve terminals. *Neuropathol Appl Neurobiol* 4, 407-418.
- Turnpenny, P., Clark, C., and Kelly, K. (1994). Intelligence quotient profile in myotonic dystrophy, intergenerational deficit, and correlation with CTG amplification. *J Med Genet* 31, 300-305.
- van der Ven, P. F., Jansen, G., van Kuppevelt, T. H., Perryman, M. B., Lupa, M., Dunne, P. W., ter Laak, H. J., Jap, P. H., Veerkamp, J. H., Epstein, H. F., and et al. (1993). Myotonic dystrophy kinase is a component of neuromuscular junctions. *Hum Mol Genet* 2, 1889-1894.
- Wang, K. H., Brose, K., Arnott, D., Kidd, T., Goodman, C. S., Henzel, W., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96, 771-784.
- Wheeler, T. M. (2008). Myotonic dystrophy: therapeutic strategies for the future. *Neurotherapeutics* 5, 592-600.
- Wheeler, T. M., Krym, M. C., and Thornton, C. A. (2007). Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 17, 242-247.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110, 385-397.
- Yadava, R. S., Frenzel-McCardell, C. D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A. L., Puymirat, J., Thornton, C. A., Prall, O. W., Harvey, R. P., and Mahadevan, M. S. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet* 40, 61-68.
- Zuchner, S., Cuccaro, M. L., Tran-Viet, K. N., Cope, H., Krishnan, R. R., Pericak-Vance, M. A., Wright, H. H., and Ashley-Koch, A. (2006). SLITRK1 mutations in trichotillomania. *Mol Psychiatry* 11, 887-889.

LEGENDS

Figure 1: DM1-hES derived cholinergic cells present the cellular and molecular features of DM1 and their obtention is not affected by the DM1 mutation.

(A) Schematic representation of the multistep protocol for the differentiation of cholinergic motor neurons. (B) Immunostaining directed against specific markers of cholinergic differentiation: Islet-1, Hb9, and VACHT. Nuclei are stained with Dapi. Bar scale = 50µm. for VACHT, bar scale=20µm. (C) Quantification of Islet-1, Hb9, and VACHT positive cells for VUB03_DM (black box), VUB01 (white box) and H9 (grey box) cell lines at 42 and 55 day *in vitro*. (D) Quantitative real-time RT-PCR analysis of the expression of the key regulatory genes Olig2, Isl1, VACHT and ChAT during the cholinergic differentiation process in the VUB03_DM1 cell lines, VUB01 and H9 control cell lines. Data (n=3) are presented as values of the undifferentiated state after normalization with cyclophilin A levels. (E) Expression of Olig2, Isl1, VACHT and ChAT on VUB03_DM1 cholinergic culture (DIV62) by quantitative RT-PCR analysis is similar to VUB01 and H9 control cell lines. (F) *In situ* hybridization combined with an immunostaining indicate the nuclear colocalization of mutant mRNA (red) and endogenous MBNL1 (green) during cholinergic differentiation of DM1 hES cell line VUB03_DM1. Scale bar = 20µm. Nuclei were stained with Dapi. Percentages of Mbnl1⁺ cells with foci are obtained by images analysis after passages of the VUB03_DM1 cells after 27 or 36 days of differentiation. (G) The histogram represents the increase of NMDAR1 exon 5 isoform in VUB03_DM and VUB24_DM in comparison to H9 control cell line. Data represent the means ± standard error of the mean (SEM) and were analyzed by ANOVA with Student t test; * $p \leq 0.05$

Figure 2: DM1 mutation results in an excessive neuritic network and a weak number of neuromuscular junctions.

(A) Immunostaining directed against the pan neuronal marker TuJ1 (in green) at 62 day in vitro in two DM1 cell lines (VUB03_DM and VUB24_DM) and two wild type cell lines (VUB01 and H9). Nuclei are stained with Dapi. Bar scale = 50µm. (B) MAP2 positive neural cells, neurite length, and MAP2 area per neuron were quantified by using image analysis instrument ArrayScan VTI HCS Reader. (C) Detection of neuromuscular junction by co immunostaining of TuJ1 (in red), and alpha bungarotoxin (BTX) (in green) in H9 cell line after 8 and 16 DIV in co-culture of neural progenitor cell and myotubes. (D) Quantification of neuromuscular junction after 8 and 16 days of co-cultures in H9 (white box), VUB03_DM (black box), and VUB24_DM (grey box). Data represent the means \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed by ANOVA with Student t test; * $p \leq 0.05$

Figure 3: Specific down expression of two members of the SLITRK family in association with DM1 mutation.

(A) Quantitative RT-PCR analysis of neuritic guidance genes at the end of the cholinergic process (DIV 62) reveals the misexpression of *SLITRK2* and *SLITRK4* in the mutated cell line VUB03_DM in comparison to the control H9 cell line (n=3). Data represent the means \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed by ANOVA with Student t test. ** $p \leq 0.005$; * $p \leq 0.05$ (B) Schematic localization of *SLITRK2* and *SLITRK4* on the chromosome Xq27 region. (C-E) Quantitative RT-PCR analysis indicates the specific down expression of *SLITRK2* and *SLITRK4* in the mutated cell line VUB03_DM, during the cholinergic differentiation, at undifferentiated state (DIV 0), NPC (DIV 36), and mature motor neurons state (DIV 62).

(F-G) Quantitative real-time RT-PCR analysis of *SLITRK2* and *SLITRK4* expression on the second mutant cell line VUB24_DM at undifferentiated state and 62 days after differentiation. Data represent the means \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed by ANOVA with Student t test. ** $p \leq 0.005$; * $p \leq 0.05$ (H) Quantitative RT-PCR analysis of expression of *SLITRK2* and *SLITRK4* in foetal and adult brains of control and DM1 patients. Data represent each patient analyzed as the means \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed by ANOVA with a non parametric median test.

Figure 4: *SLITRK2* and *SLITRK4* overexpression in DM1 neural progenitors rescue the neuritic outgrowth.

(A) Immunostaining directed against TuJ1 (in red), 7 days after *SLITRK2* and *SLITRK4* transfections into neuronal progenitor cells derived from VUB03_DM cell line. H9 cell line was used as negative control. Nuclei are stained with Dapi. Bar scale = 50 μ m. (B) Histograms represent the number of cell counted for the analysis and the neuritic average intensity per TuJ1 positive cells in VUB03_DM transfected by a GFP control plasmid (white box), pcDNA3-*SLITRK2* (light grey box), pcDNA3-*SLITRK4* (grey box), a combination of these two plasmids (dark grey box), and in VUB01 transduced by a GFP control shRNA (black box). Data were issued from image analysis instrument ArrayScan VTI HCS Reader.

Figure 5: ShRNA down expression of *SLITRK2* and *SLITRK4* induces an increase of the neuritic outgrowth.

(A) Immunostaining directed against TuJ1 (in red), 7 days after the ShRNA *SLITRK2* and ShRNA *SLITRK4* transductions into neuronal progenitor cells (24 DIV) in the VUB01 control cell line. VUB03_DM cell line is used as a positive control. Nuclei are stained with Dapi. Bar scale = 50 μ m. (B) These histograms represent the number of cell used for the analysis, the

neurite average length and neurite average area per neuron TuJ1 in VUB01 transduced by a GFP control shRNA (white box), *SLITRK2* shRNA (grey box), *SLITRK4* shRNA (dark grey box), and in VUB03_DM transduced by a GFP control shRNA (black box). Data issued from image analysis instrument ArrayScan VTI HCS Reader.

Figure 1 - Marteyn et al.

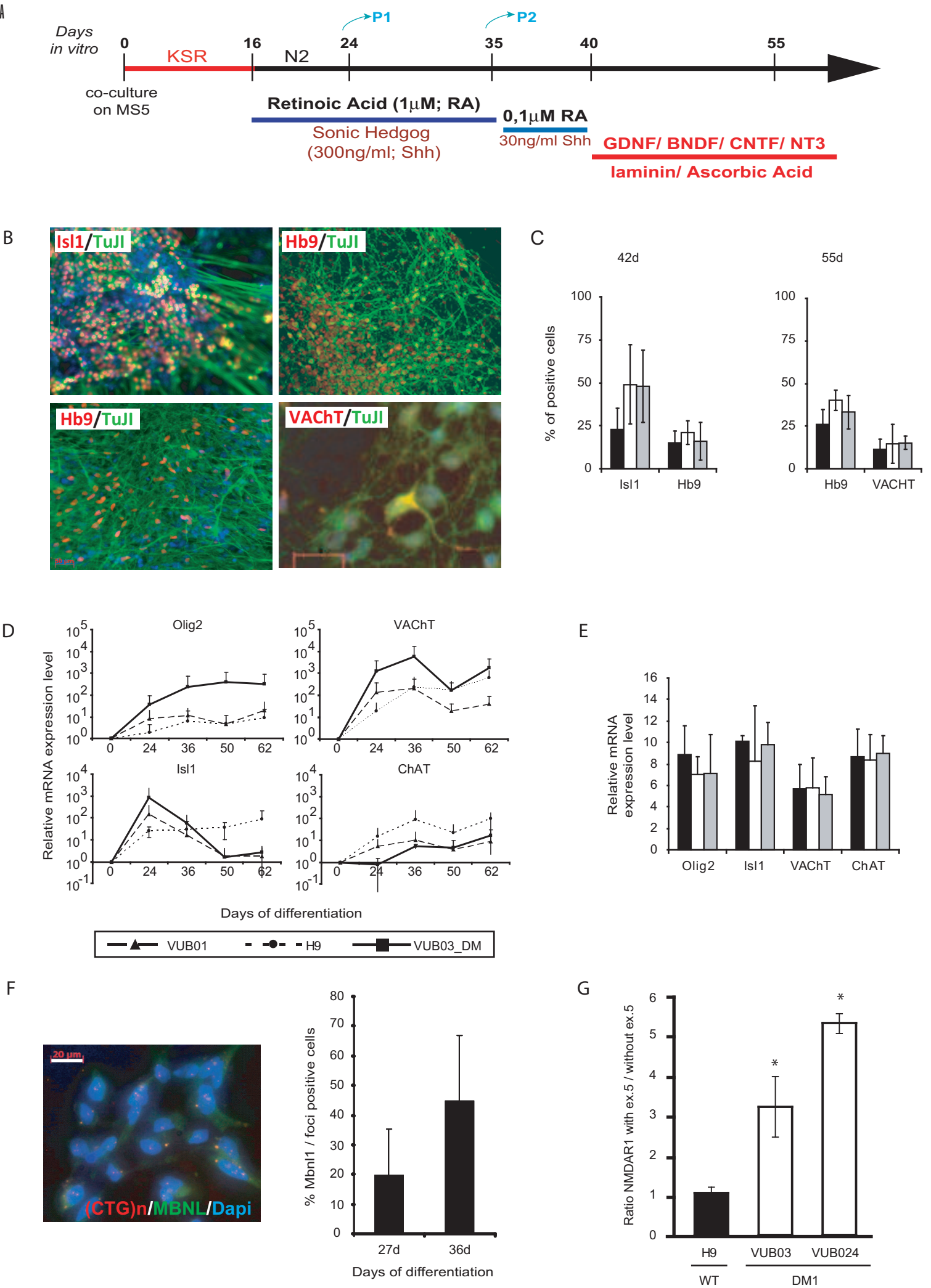
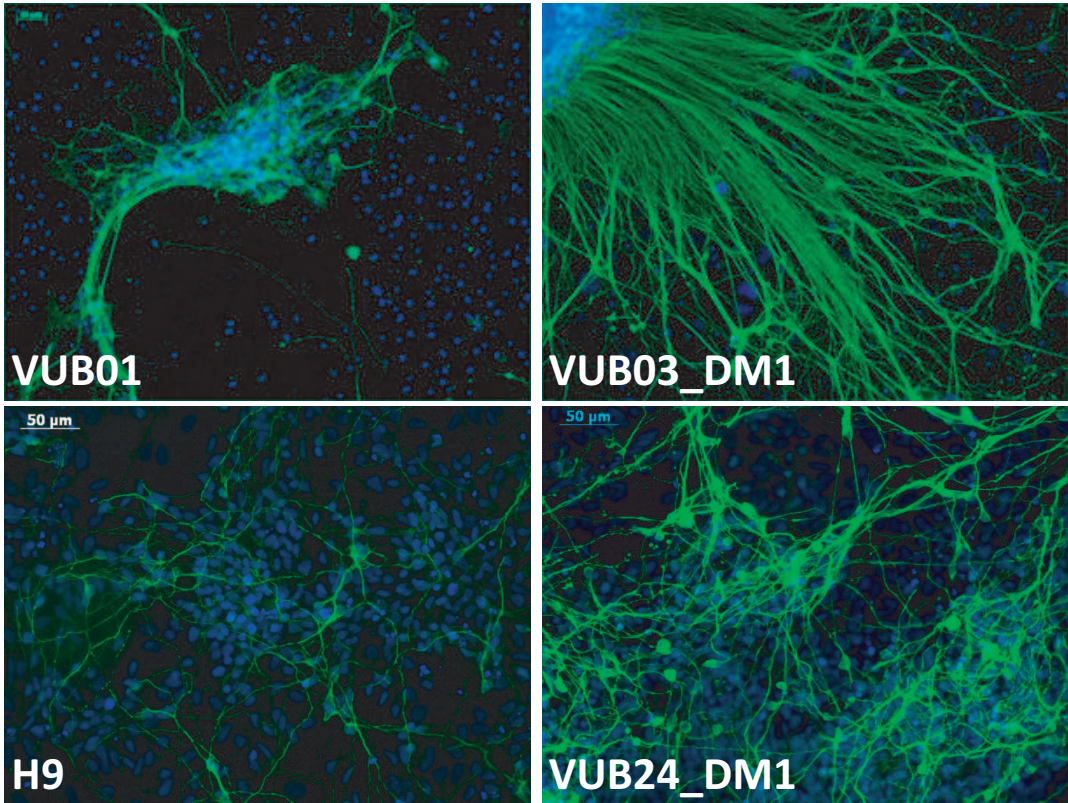
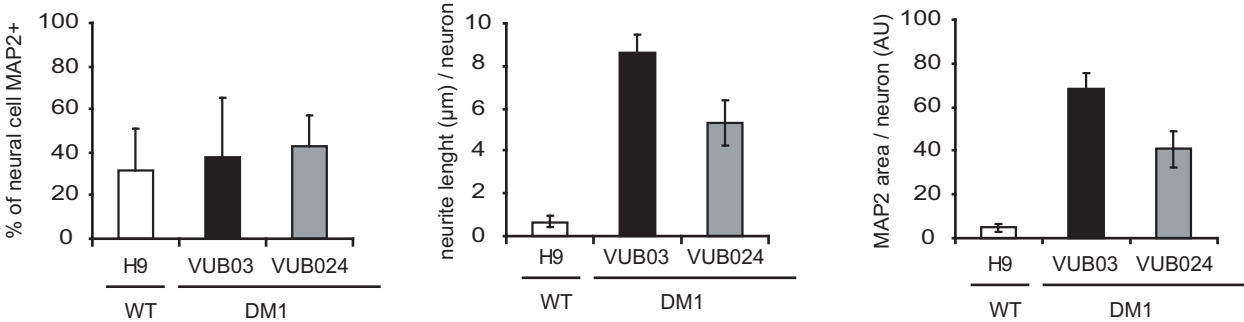


Figure 2 - Marteyn et al.

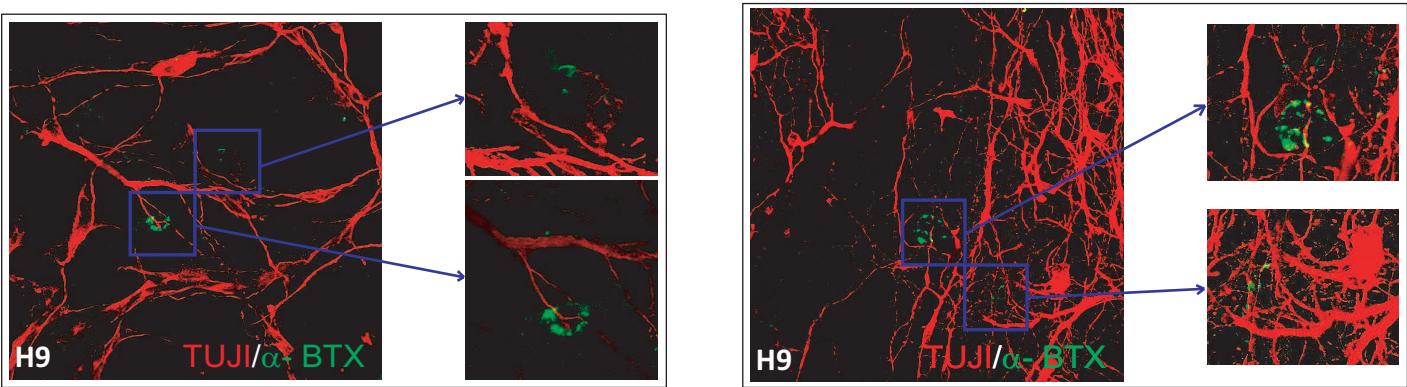
A



B



C



D

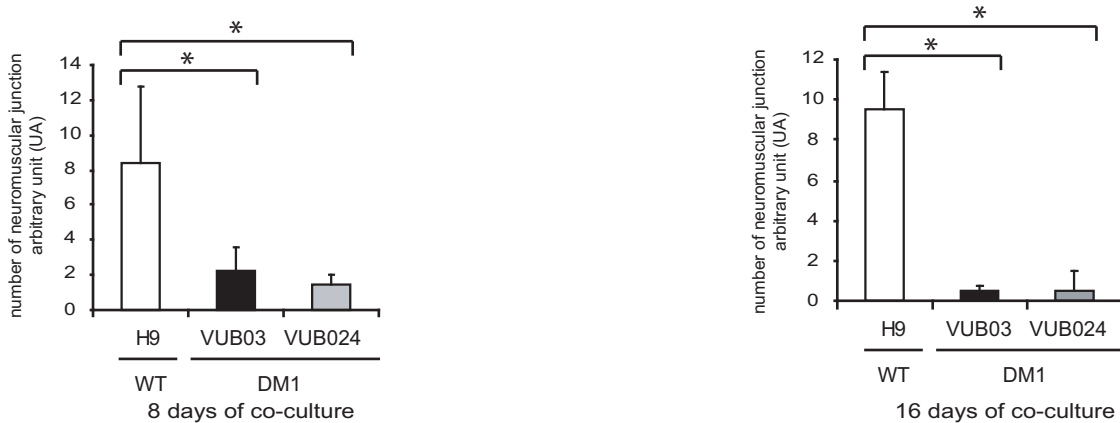
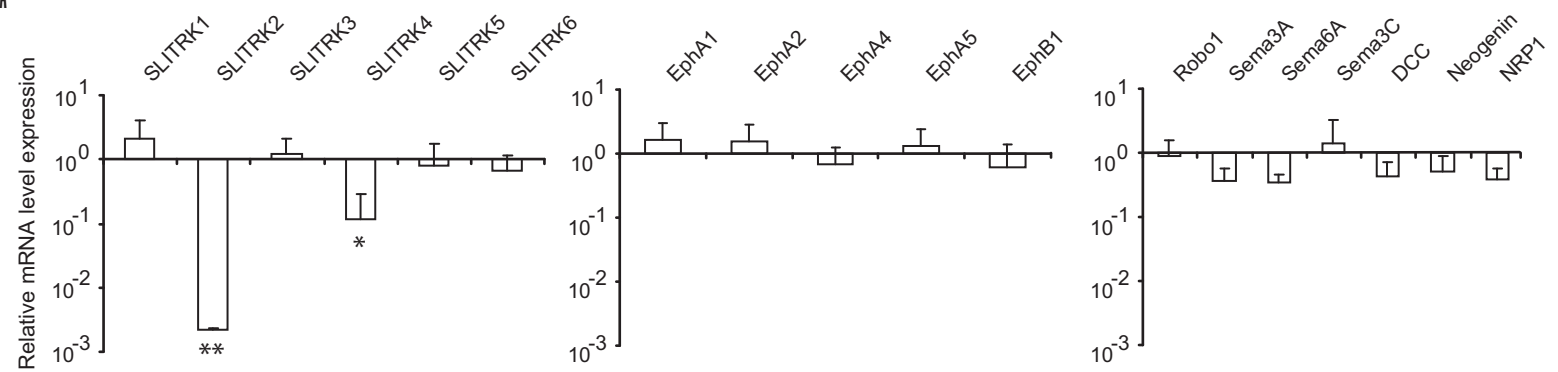
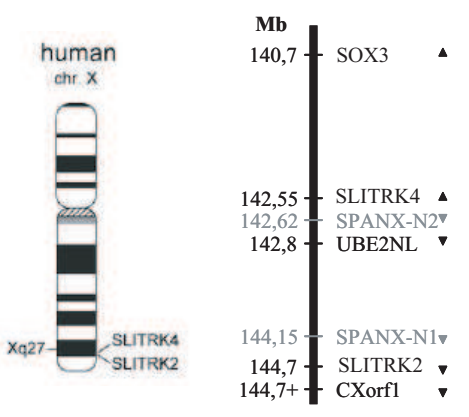


Figure 3 Marteyn et al.

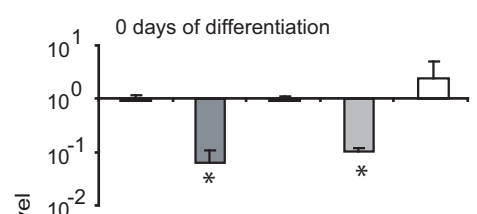
A



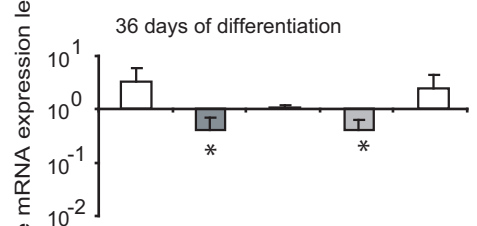
B



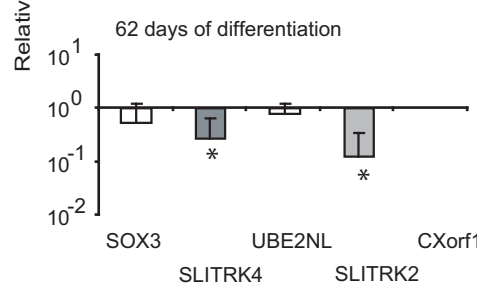
C



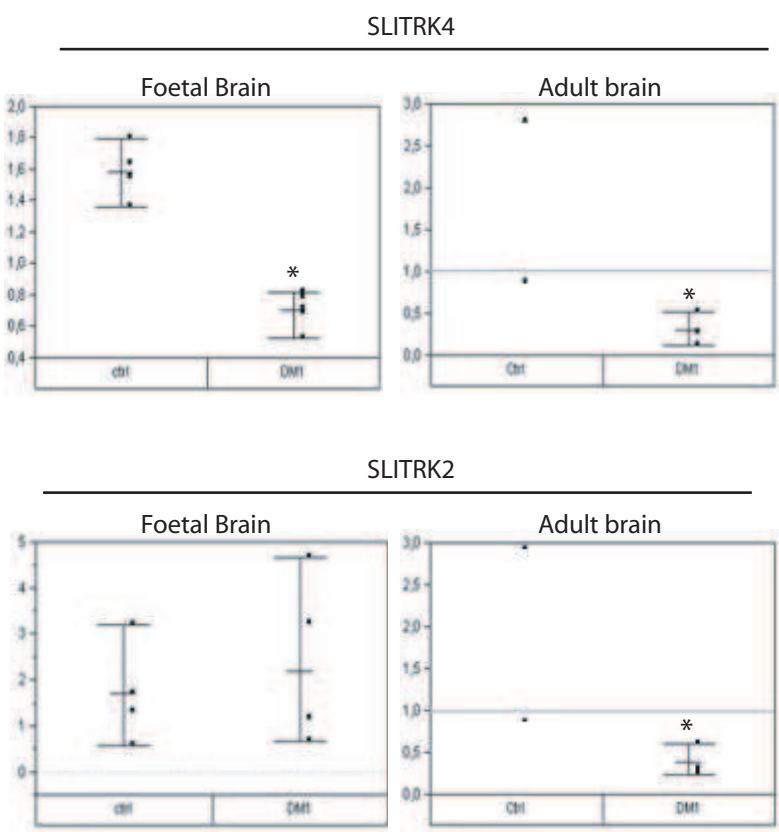
D



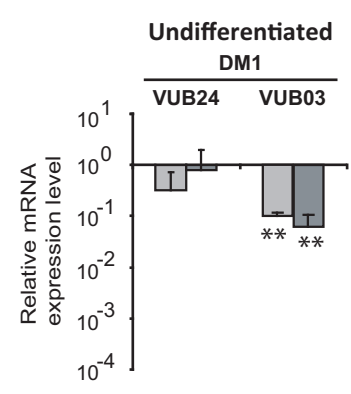
E



H



F



G

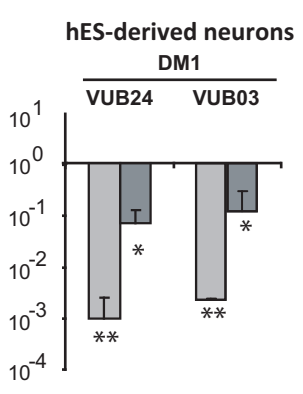
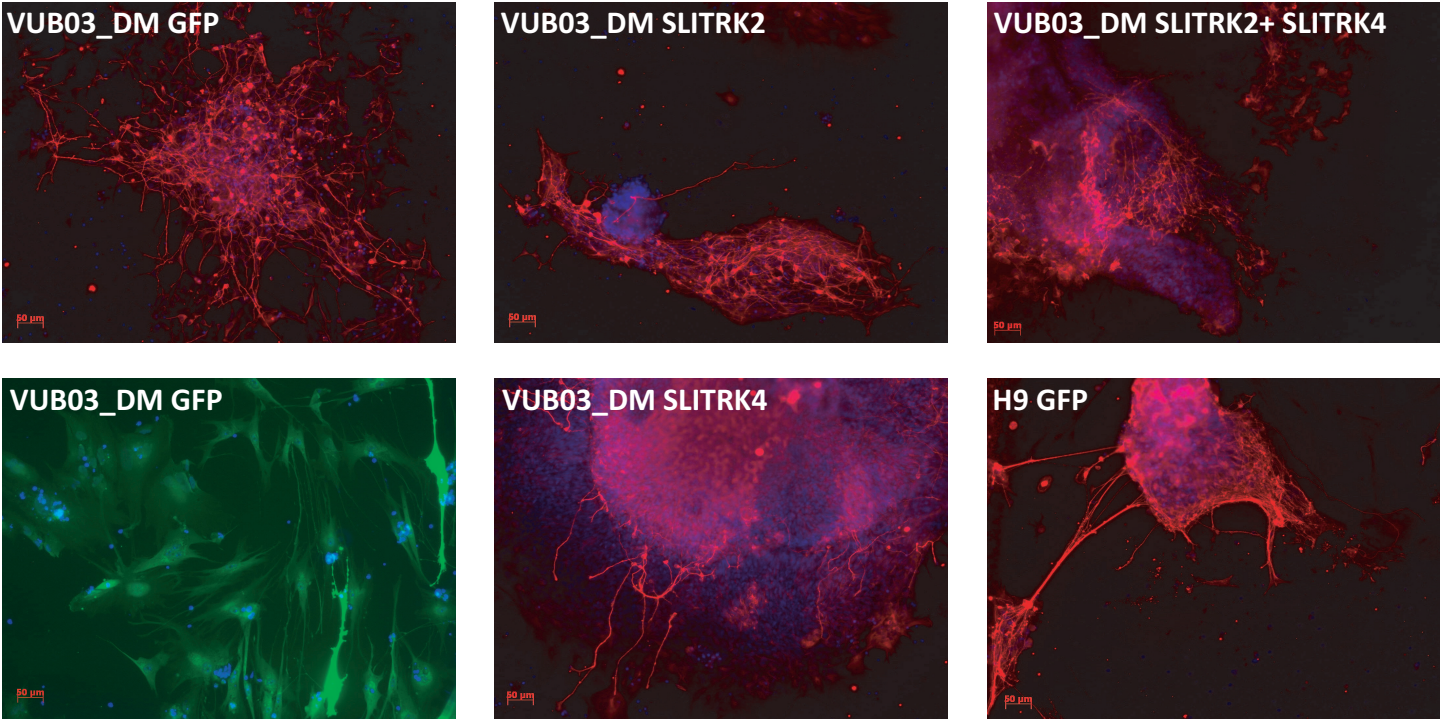


Figure 4 - Marteyn et al.

A



B

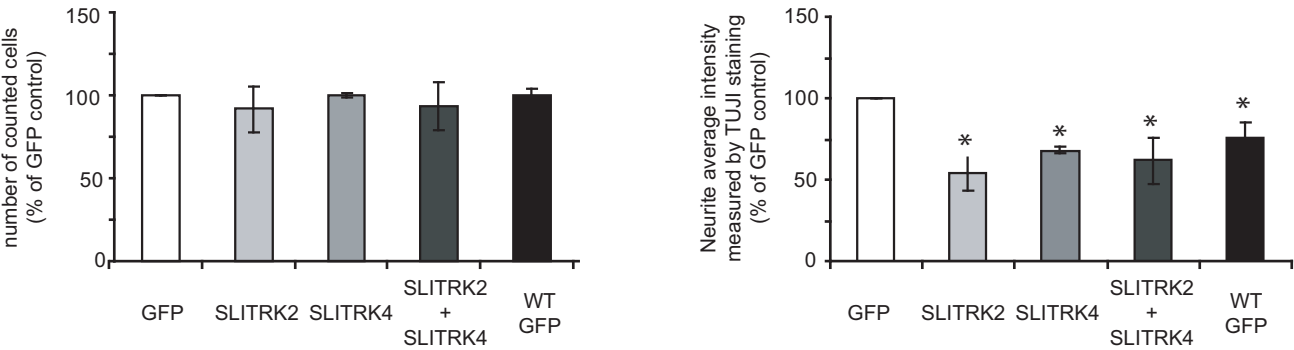
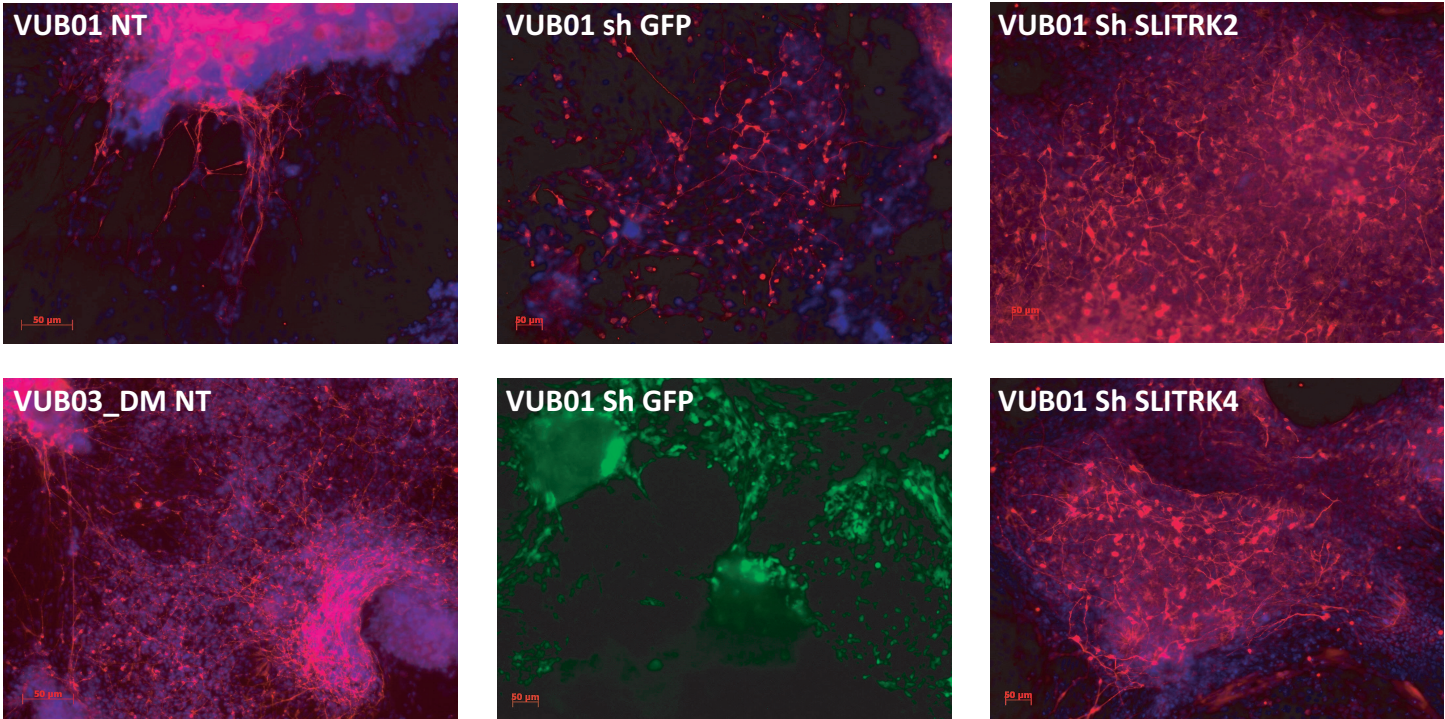
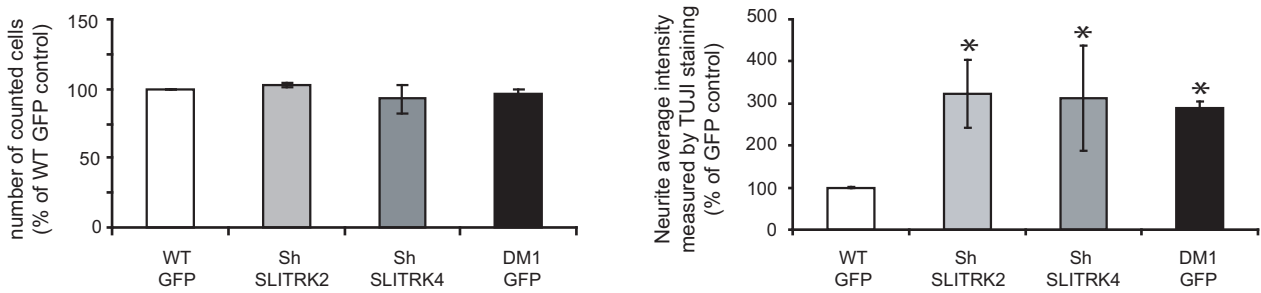


Figure 5- Marteyn et al.

A



B



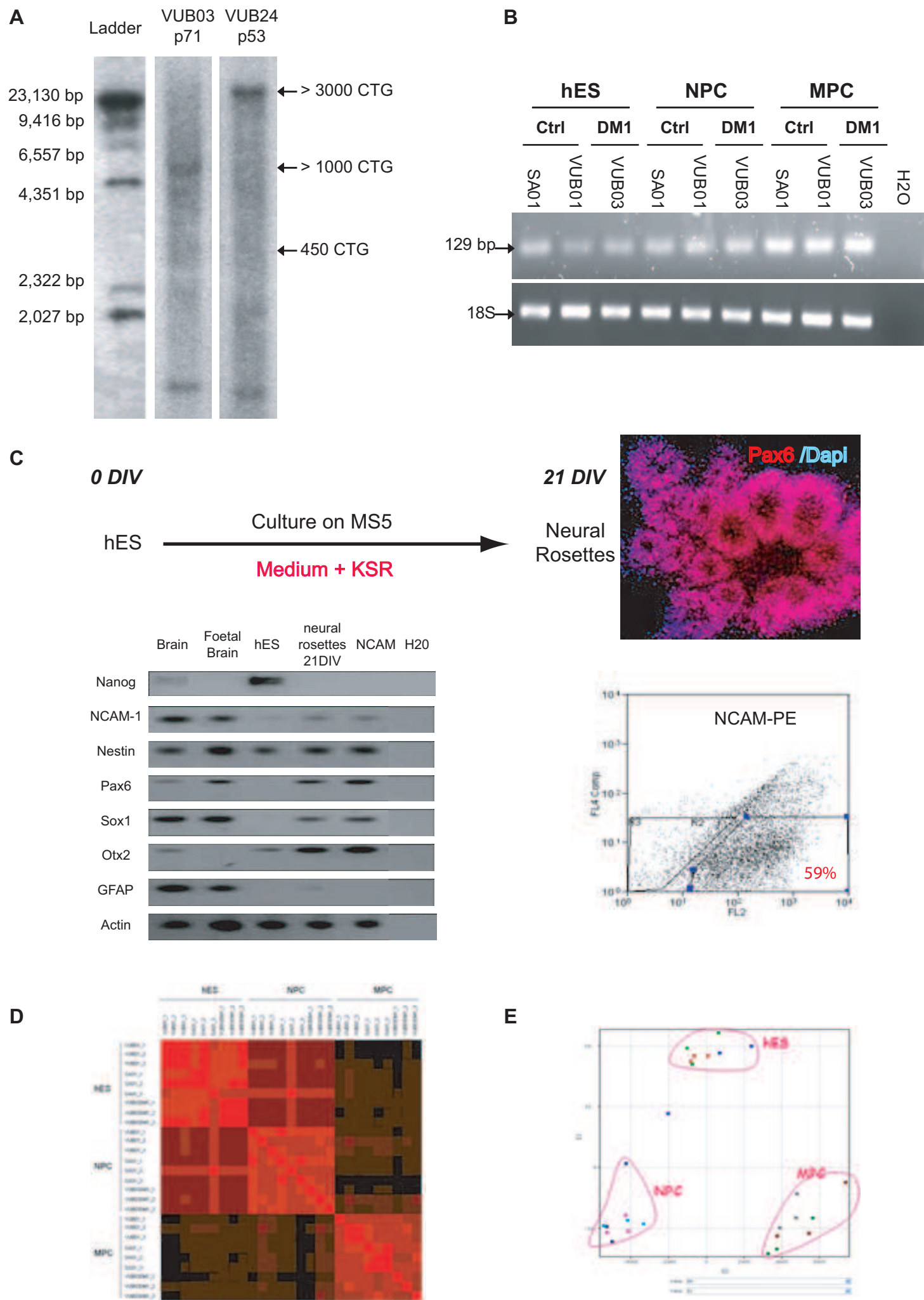
Gene under-expressed in VUB03_DM1							
Gene Title	Gene Symbol	Chromosome Number	Entrez Gene	Unigene	Fold change hES	Fold change NPC	Fold change MPC
zinc finger protein 37a (KOX 21)	ZNF37A	chr10	7587	Hs.292575	3,78	11,85	10,71
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5	PSMD5	chr9	5711	Hs.193725	8,34	3,21	
zinc finger protein 248	ZNF248	chr10	57209	Hs.25275		54,62	
SLIT and NTRK-like family, member 4	SLITRK4	chrX	139065	Hs.272284		20,84	
EPH receptor A5	EPHA5	chr4	2044	Hs.479853			22,36
paired related homeobox 1	PRRX1	chr1	5396	Hs.283416			9,22
nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	NAPRT1	chr8	93100	Hs.493164			7,72
ribosomal protein L31	RPL31	chr2	6160	Hs.518551			6,17

Gene over-expressed in VUB03_DM1							
Gene Title	Gene Symbol	Chromosome Number	Entrez Gene	Unigene	Fold change	Fold change	Fold change
trafficking protein particle complex 3	TRAPPC3	chr1	27095	Hs.523131	2,61	3,20	
cathepsin B	CTSB	chr8	1508	Hs.520898	2,09	3,17	
maternally expressed 3	MEG3	chr14	55384	Hs.279815	8,79		90,57
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NQO2	chr6	4835	Hs.533050	5,16		3,08
interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	chrX	3597	Hs.496646		5,41	
eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa	EIF2S3	chr12	1968	Hs.539684		2,57	
prickle-like 1 (Drosophila)	PRICKLE1	chr12	144165	Hs.524348	2,92		

Table 1 : Gene with modulations in at least in one of the three cell type populations.

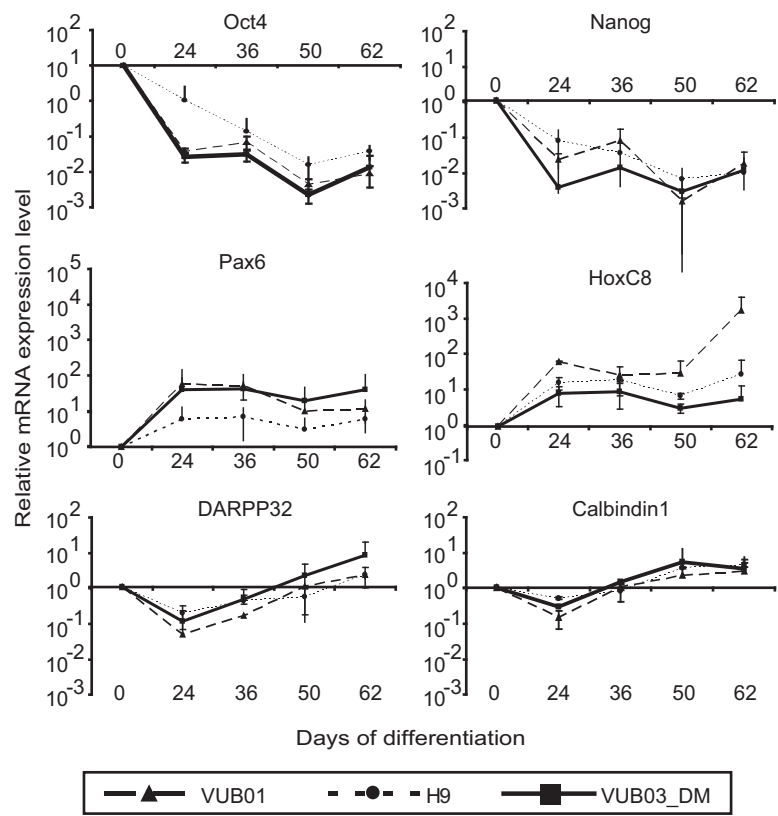
Table 1. Marteyn-Slitrk

Supplementary Figure 1 - Marteyn et al.

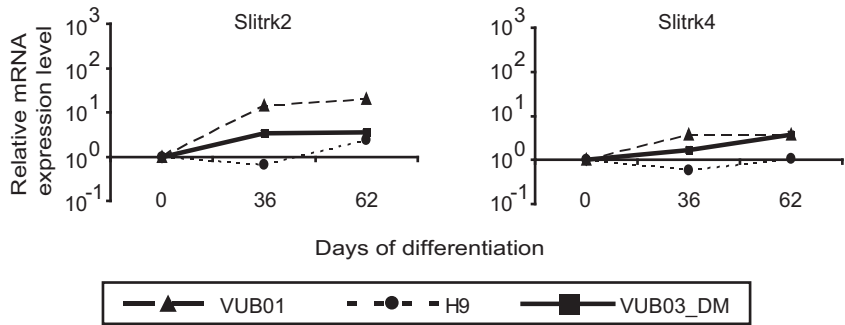


Supplementary Figure 2 - Marteyn et al.

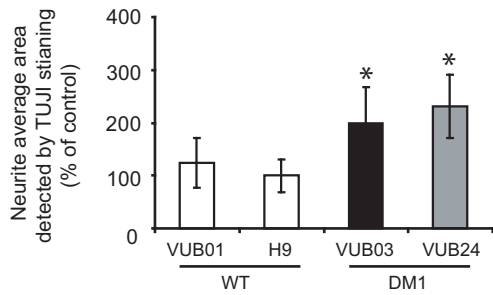
A



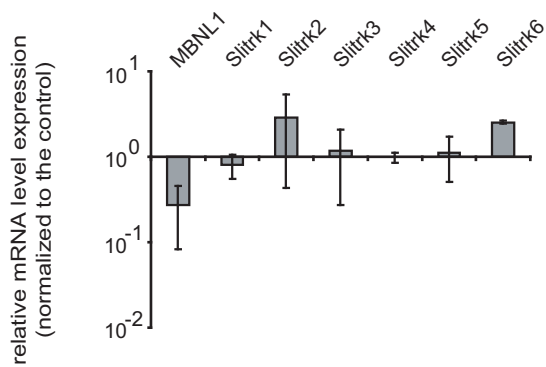
B



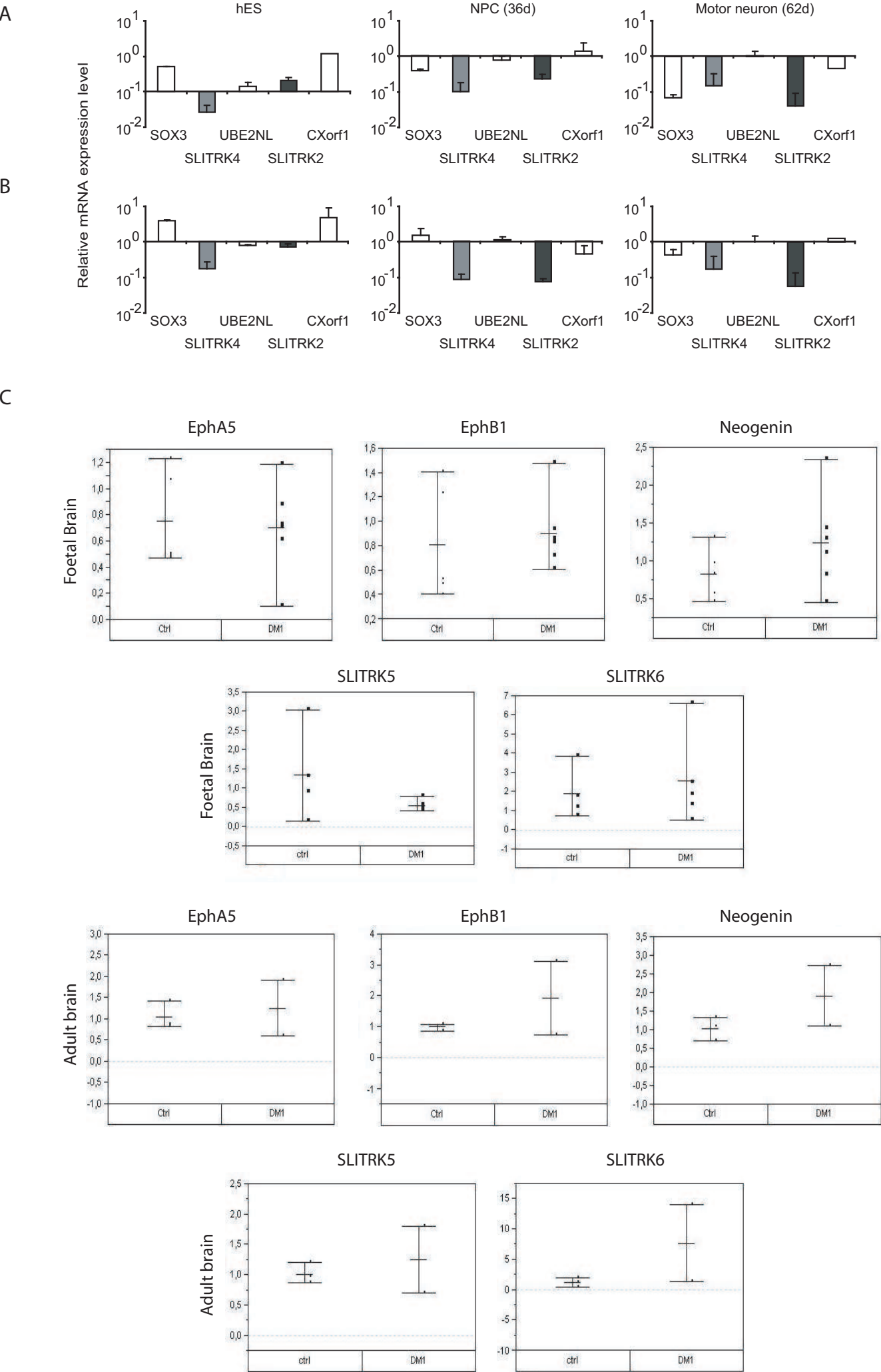
C



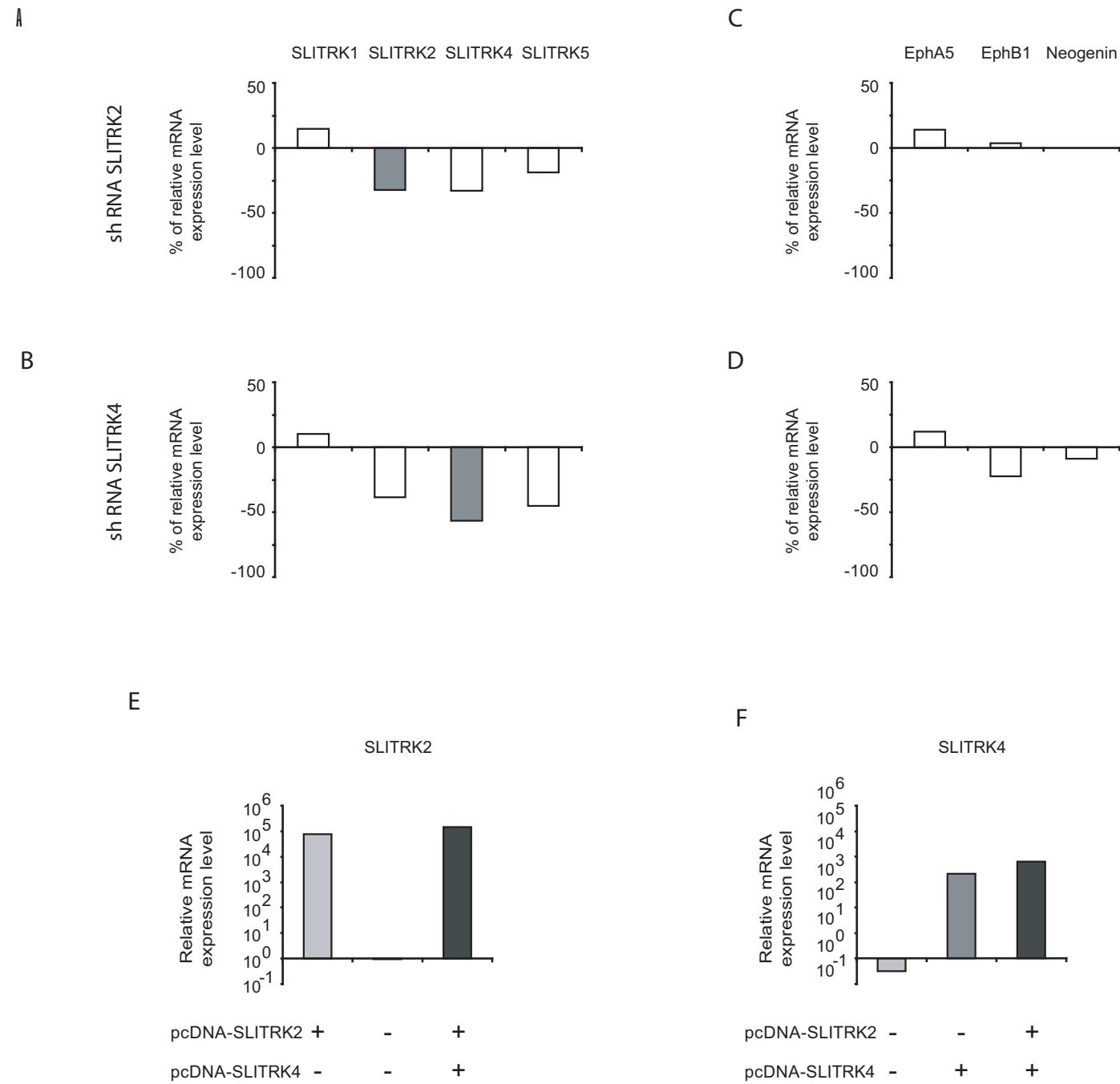
D



Supplementary Figure 3 - Marteyn et al.



Supplementary Figure 4 - Marteyn et al.



Supplementary Table 1: list of primers used for the study
Marteyn et al.

Gene	F / R	Nucleotide sequence	Gene	F / R	Nucleotide sequence
Actin (PCR)	F R	CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	Nestin (PCR)	F R	AGA GAA CCA GGA GCC ACT GA TTC TCT TGT CCC GCA GAC TT
Calbindin1	F R	TCA GGA CGG CAA TGG ATA CA AAG AGC AAG ATC CGT TCG GT	Oct4	F R	CTT GCT GCA GAA GTG GGT GGA GGA A CTG CAG TGT GGG TTT CGG GCA
ChAT	F R	GAC TCG CTG GAC ATG ATT GA TGC AGG GAC TTG TCG TAC C	Olig2	F R	AAG TCA TCC TCG TCC AGC AC GCG GCT GTT GAT CTT GAG AC
CXorf1	F R	TCT GCT CAA GCA CTT TCG AC CAT TTT GCT GTG CTG ATG CT	Otx2 (PCR)	F R	ACA AGT GGC CAA TTC ACT CC ATG CCC CCA AAG TAG GAA GT
Cyclophilin A	F R	CCC ACC GTG TTC TTC GAC AT CCA GTG CTC AGA GCA CGA AA	Pax6 (PCR)	F R	GGC AAC CTA CGC AAG ATG GC TGA GGG CTG TGT CTG TTC GG
DARPP32	F R	CCT GAA GGT CAT CAG GCA GT GGT CTT CCA CTT GGT CCT CA	Pax6	F R	GGC AAC CTA CGC AAG ATG GC TGA GGG CTG TGT CTG TTC GG
DCC	F R	AGA CGT CTG AGG TGC GAC TT ATG TGC AGT CAT GCT CCA AG	Robo1	F R	CCA CTC AGC TCA TCC AGT CA CTG TCC CAG TGG TTT CCA GT
EphA1	F R	TGC AGC AGT ATA CGG AGC AC TTG ATG TCG TCG TTG GTC AT	Sema3A	F R	TGG ACA TCA TCC TGA GGA CA CAA AGT CTC GCC CCA TAA AA
EphA2	F R	TGC AGC AGT ATA CGG AGC AC TTG ATG TCG TCG TTG GTC AT	Sema3C	F R	CTG TTG TGA CGG ACA AA TGG ATC TCC CTG CTG ATG TTG CT
EphA4	F R	CAT GAA GCT GAA CAC CGA GA GAC GTA TCA GCC CCT GTG AT	Sema6A	F R	GCA CAA CCA CAT CAG ATT CG GCT GTC AGG TGA GTC AAG CA
EphA5	F R	GAC TGC CCC AGA AGC AAT AG TTG GTC ATC TCC CAG TAG GG	Slitrk1	F R	AAC GTT ACA GGG GAC GTT TG GAA ACG CTG CAG ACT TGT GA
EphB1	F R	CTT ACG AGG ATC CCA ACG AA CAA ACG CCC CTT GTA CAC TT	Slitrk2	F R	TGC AGT CAT TCA GGA AGG TG GCT CTG CAG TCC ATC AAA CA
GFAP (PCR)	F R	CAG GAC CTG CTC AAT GTC AA ATC TCC ACG GTC TTC ACC AC	Slitrk3	F R	TGT TCC GAG GCC TAC AGA GT GTC TGT TGG CAG AGT CCT CA
HoxC8	F R	CTC AGG CTA CCA GCA GAA CC TTG GCG GAG GAT TTA CAG TC	Slitrk4	F R	TCA GCC CTG ATT TCT TCG ACA CTC ACA GTT GAC ATA GAG CAC AT
Isl1	F R	AGC AGC CCA ATG ACA AAA CT TTT CCA AGG TGG CTG GTA AC	Slitrk5	F R	GTG ACA TTG TGG GCA TGA AG GTG TGG GCG TGG AAA CTA CT
Mbnl1	F R	AGC GTG TGT GCA AAC TCT TG TTT GAA GGG GTA TGG AGT GC	Slitrk6	F R	TAT GGT CAC CAC TCC TGC AA AAC CAC TAT CCC TGC AGC AC
Nanog (PCR)	F R	ATA CCT CAG CCT CCA GCA GA ATT GTT CCA GGT CTG GTT GC	Sox1 (PCR)	F R	CAA TGC GGG GAG GAG AAG TC CTC TGG ACC AAA CTG TGG CG
Nanog2	F R	CAA AGG CAA ACA ACC CAC TT TCT GCT GGA GGC TGA GGT AT	Sox3	F R	GGT ACA GAC CAG GAC CGT GT GTC GAT GAA TGG TCG CTT CT
NCAM-1 (PCR)	F R	TTG TTT TTC CTG GGA ACT GC ATC CTC GCC TGT AAC CAC AC	UBE2NL	F R	CCT TTG AGG GAG GGA CTT TT GCC TGG ATC GAT AGC AGA AC
Neogenin	F R	AGA GGG CAT GAG TCA GAG GA GCT GGA GTG GAA ATG ATG GT	VACht	F R	TAC CCT ACG GAG AGC GAA GA GGC GAA CAG GAC TGT AGA GG
NRP1	F R	CCA CAG TGG AAC AGG TGA TG GCA CGT GAT TGT CAT GTT CC			

Supplementary legends

Supplementary Figure 1: Molecular characterization of the DM1-mutated hES cells and their progenies.

(A) Determination of the CTG repeat size in the two DM1 hES-derived MPC cell lines: VUB03 (1050 CTG) and VUB24 (>2000 CTG). (B) Analysis of DMPK gene expression by semi-quantitative RT-PCR in undifferentiated hES cells, derived-NPC (Neural Precursors Cells) and MPC (Mesenchymal Precursors cells). Control (SA01, VUB01) and mutant (VUB03) cells were analyzed in parallel. (C) hES-derived NPC were obtained from neural rosettes obtained after co-culture of undifferentiated hES on stromal cells (MS5) in presence of KSR medium for 21 days. NCAM⁺ positive cells were isolated from neural rosettes by facs-sorting, corresponding to 59% of cells and presenting the characteristics of neural precursor cells, as identified by RT-PCR analysis. (D) Correlation coefficient between triplicate samples for hES, NPC and MPC derived from VUB03_DM1 and two controls, VUB01 and SA01, cells. Red gradient represents R^2 ranging from 0.98 to 0.95. (E) Principal Component Analysis (PCA) of the normalized hybridization intensity values on DNA chips for all cell lines and phenotypes, and projected on the first two axis (E0 and E1). Each square indicates the expression values for one DNA Chip, colours represent the biological triplicates for the same cell line. Data were obtained with Array Assist software (Stratagen).

Supplementary Figure 2: No alteration of the expression of neuronal markers along the cholinergic differentiation by the DM1 mutation.

(A) Kinetics of expression, measured by quantitative RT-PCR analysis, of genes involved in the pluripotency of hES cells Oct-4, Nanog; in the early neural differentiation Pax6, HoxC8; and neuronal genes do not involved in the cholinergic differentiation DARPP32, Calbindin1, during the cholinergic differentiation process in the VUB03_DM1 cell lines, VUB01 and H9

control cell lines. Data (n=3) are presented as values of the undifferentiated state after normalization with cyclophilin A levels. (B) Quantitative RT-PCR reveals similar kinetic of *SLITRK2* and *SLITRK4* expression during the cholinergic differentiation in the mutated VUB03_DM cell line and VUB01 and H9 control cell lines.

Supplementary Figure 3: DM1 specific down expression of *SLITRK2* and *SLITRK4* genes.

(A-B) Quantitative RT-PCR analysis indicates the specific down expression of *SLITRK2* and *SLITRK4* in the mutated cell line VUB03_DM, during the cholinergic differentiation, at undifferentiated state, NPC (36 days *in vitro*), and mature motor neurons state (62 days *in vitro*). Data (n=3) are presented as values of the control (A) SA-01 and (B) VUB01 cell lines. (C) Quantitative real-time RT-PCR analysis reveals similar expression of neuritic guidance genes in adult and in foetal brains of control and DM1 patients.

Supplementary Figure 4: Specificity of pcDNA- *SLITRK* plasmids and shRNA *SLITRK*.

(A-B) Percentage of relative mRNA expression level of *SLITRK* family gene and (C-D) other neuritic guidance genes after lentiviral transduction of (A, C) shRNA *SLITRK2* and (B, D) shRNA *SLITRK4* by quantitative real-time RT-PCR. (E-F) Quantitative RT-PCR analysis indicates the expression of (E) *SLITRK2* and (F) *SLITRK4* after nucleofection of pcDNA-*SLITRK2* plasmid (light grey box), pcDNA-*SLITRK4* plasmid (grey box) and the combination of these two plasmids (dark grey box) in VUB03_DM neural progenitors.

d'EphA5 avec ses deux régions introniques adjacentes dans un plasmide exprimant la α -globine humaine. Ce plasmide a déjà été décrit comme permettant d'étudier les phénomènes d'épissage alternatif en permettant de valider l'effet de la mutation DM1 sur l'épissage alternatif du gène codant pour le récepteur à l'insuline (Ho *et al.*, 2004). La transfection transitoire de ce minigène dans des cellules HEK 293T saines avec un plasmide exprimant 960 répétitions CTG aboutit, comme attendu, à une augmentation de l'exon 9 d'EphA5 par rapport à la co-transfection avec un plasmide contrôle GFP (Figure 1E).

L'ensemble de ce travail nous a donc permis d'identifier un nouveau défaut d'épissage alternatif spécifiquement associé à l'expression de la mutation DM1 et affectant l'expression d'un gène au niveau du système nerveux central. De part son rôle connu dans la guidance neuritique, cette modulation d'expression génique pourrait contribuer à des altérations neuritiques décrites précédemment. Une étude est actuellement en cours au laboratoire afin d'approfondir les implications fonctionnelles que peut générer l'expression de cette isoforme spécifique.

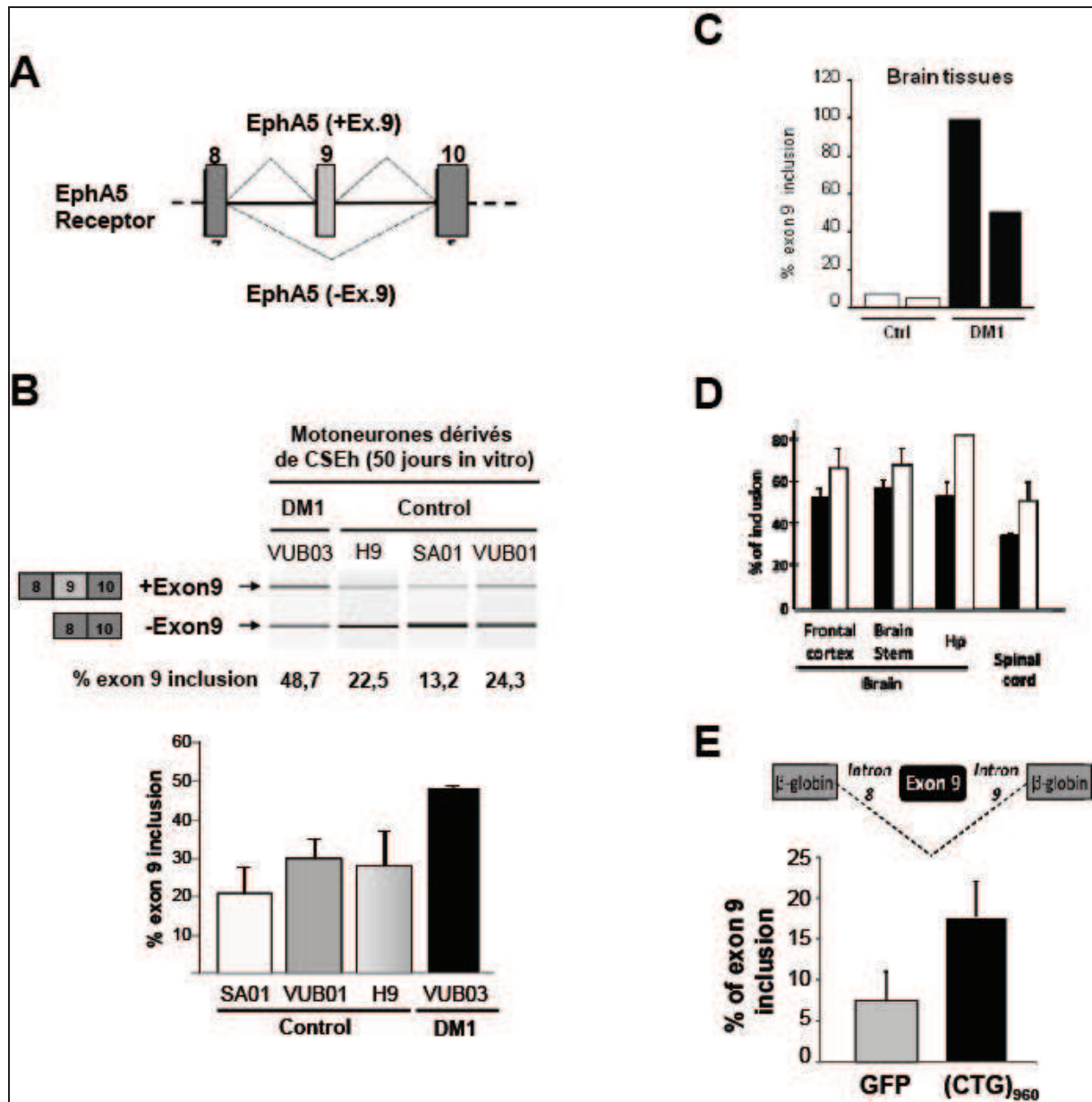


Figure 1 : La DM1 est associée à un défaut d'épissage alternatif du récepteur à l'ephreine A5.

(A) Représentation schématique des deux isoformes décrites pour le gène codant pour le récepteur à l'ephreine A5 (EphA5). (B) Augmentation de l'expression de l'isoforme incluant l'exon 9 dans les cultures neuronales issues des CSEh mutées par rapport aux cultures contrôles. Les données représentent le pourcentage d'inclusion de l'exon 9 détecté par une analyse quantitative sur puce Agilent et par RT-PCR (n=3). (C) Anomalie de l'expression de l'isoforme contenant l'exon 9 dans des biopsies cérébrales issues de patients DM1. Les résultats ont été obtenus et sont présentés de façon similaire à la figure précédente. (D) Anomalie de l'expression de l'isoforme 7 murin (homologue de l'exon 9 humain) dans des régions cérébrales et spinales issues de souris transgéniques DM1 (■) par rapport aux tissus des souris contrôles (□). (E) Représentation schématique du minigène contenant l'exon 9 d'EphA5 et de ses régions introniques adjacentes. Augmentation transitoire de l'inclusion de l'exon 9 du gène EphA5 après co-transfection du mini-gène contenant l'exon 9 d'EphA5 et d'un plasmide mimant la mutation ((CTG)₉₆₀) (■), dans des cellules contrôles HEK par rapport à un plasmide contrôle GFP (■). Les données de l'inclusion de la région d'intérêt a été analysée 48h après transfection par analyse quantitative par puce Agilent.

L'ensemble de ces résultats stipulent que la mutation DM1 serait spécifiquement responsable d'une altération de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de la guidance neuritique. De plus, ils suggèrent que le développement ou le maintien des jonctions neuromusculaires est affecté par les répétitions CTG de la DM1.

En plus de la démonstration du concept que les cellules souches embryonnaires humaines peuvent se révéler être un outil cellulaire puissant pour étudier les mécanismes impliqués dans les diverses maladies génétiques humaines, les différents résultats présentés dans cette première partie révèlent un défaut développemental précoce de gènes fortement impliqués dans la neuritogenèse et la mise en place des connexions neuromusculaires. Que ce soit par des anomalies d'expression ou d'épissage alternatif, ces mécanismes pathologiques peuvent avoir des répercussions significatives sur la faiblesse et l'atrophie musculaire observées dans la DM1.

1. Association et implication de l'altération du facteur de transcription ZNF37A dans la DM1

1.1. Défaut d'expression d'un nouveau facteur de transcription associé à la DM1

Parmi les différents gènes identifiés par l'approche transcriptomique (décrite en 1), le gène *ZNF37A* (Zinc finger protein A37 ou KOX21) présente la caractéristique d'être le gène le plus fortement modulé dans les cellules DM1, et ce quelque soit l'état de différenciation des cellules (non différenciées, précurseurs neuraux, précurseurs mésenchymateux). Son expression est diminuée d'un facteur 12 par puce Affymetrix et supérieure à 100 par RT-PCR, entre les cellules porteuses de la mutation DM1 et les cellules contrôles.

La présence de 12 motifs à doigts de zinc ainsi que de deux domaines Krab (Krüppel-associated box) dans sa région C-terminale, suggère que le gène *ZNF37A* code pour une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription à domaine Krab caractérisés par leurs propriétés de répresseur de la transcription et de régulateur de l'épissage de certains ARNs (Urrutia, 2003). Situé au niveau du centromère du chromosome 10 (10p11.2) chez l'Homme, *ZNF37A* est intégré dans un cluster de gènes de la même famille, comme c'est le cas pour la majorité des facteurs de transcription à domaine Krab. L'analyse de sa séquence a permis de révéler un pseudo-gène, *ZNF37B*, qui présente environ 80% d'homologie avec *ZNF37A* et qui résulterait d'une duplication centromérique de *ZNF37A* (Tunnacliffe *et al.*, 1993). La vérification de l'expression normale des autres gènes du cluster comprenant *ZNF37A* par RT-PCR nous a permis d'écarter l'hypothèse d'une quelconque délétion chromosomique et de confirmer la diminution spécifique de *ZNF37A* dans nos différentes populations cellulaires mutées. Nous avons également confirmé cette modulation d'expression de *ZNF37A* à la fois par hybridation *in situ* mais également au niveau protéique, nous permettant de confirmer la localisation nucléaire de *ZNF37A*, en concordance avec sa potentielle fonction de facteur de transcription. De façon intéressante, nous avons également observé cette diminution d'expression dans des biopsies de tissus musculaires et nerveux, issus de patients DM1, ce qui nous a permis d'associer la diminution d'expression spécifique du gène *ZNF37A* à la DM1.

Suite à ces résultats, nous avons à la fois cherché à identifier les mécanismes moléculaires responsables de la diminution de l'expression de *ZNF37A* par la présence de la mutation DM1, et à découvrir les potentielles conséquences physiopathologiques de cette modulation génique.

1.2. Mécanismes moléculaires de la régulation de l'expression du facteur de transcription ZNF37A par la mutation DM1

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'effet de la mutation DM1 sur l'expression de *ZNF37A*. Il peut en effet s'agir d'un défaut affectant l'épissage alternatif, d'une anomalie de transcription ou

encore d'un manque de stabilité de l'ARNm. Dans la mesure où la DM1 est plus fréquemment associée à des anomalies de maturation des ARNm, nous avons, dans un premier temps, testé cette hypothèse. Bien que le gène ZNF37A code pour une unique protéine, deux transcrits avaient été identifiés au niveau de sa région 5'UTR. Ces deux variants diffèrent par la présence ou non d'une séquence de 474 nucléotides, correspondant à l'exon 2 et une partie de l'exon 3. De façon intéressante, nous avons corrélié l'absence d'expression du variant 1, correspondant à la forme entière de l'ARNm de ZNF37A, à la diminution d'expression totale de ZNF37A. Ces résultats ont été observés à la fois dans les deux lignées de CSEh DM1 quelque soit leur état de différenciation, mais également au niveau de biopsies de patients DM1. Afin d'évaluer si l'insertion de cette séquence est dépendante d'un épissage alternatif, nous avons utilisé la même stratégie que celle décrite précédemment pour l'étude de l'inclusion de l'exon 9 d'EphA5. Dans le cas de ZNF37A, la séquence génomique comprise entre la fin de l'intron 1 et le début de l'intron 3 de ZNF37A a été clonée dans le plasmide exprimant la α -globine humaine. Bien que la co-transfection avec le plasmide CTG₍₉₆₀₎ semble indiquer que les répétitions CTG sont significativement responsables de l'exclusion de la séquence de 474 nucléotides du variant 1 de ZNF37A, il n'a été observé aucun effet des protéines CUGBP1, CUGBP2 et MBNL1 sur l'inclusion de cette séquence. Ce résultat fort surprenant suggérerait soit l'implication de nouveaux facteurs d'épissage dont l'expression aurait été modifiée par la mutation DM1, soit l'intervention d'autres mécanismes affectant la transcription ou la stabilité de l'ARNm. Nous avons tout d'abord testé cette dernière hypothèse en mesurant la stabilité de l'ARNm codant pour ZNF37A après avoir inhiber sa transcription par traitement à l'actinomycine D. Dans ces conditions, nous avons constaté que la stabilité des transcrits de ZNF37A étaient fortement diminuée dans les cellules mutées par rapport aux cellules contrôles alors que la stabilité du transcrit ZNF37B reste statistiquement inchangée. Afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle la région de 474 nucléotides, localisée en 5'UTR du transcrit ZNF37A, pourrait être responsable de ce phénotype, nous avons cloné cette région en amont du gène codant pour la luciférase. Comme nous l'espérions, cette approche nous a ainsi permis de montrer que l'expression du plasmide CTG₍₉₆₀₎ entraînait en une forte diminution de l'expression de la luciférase. De plus, nous avons également montré que la surexpression de la protéine MBNL1 augmentait l'expression de la luciférase alors que l'expression forcée de CUGBP1 était responsable de la diminution de l'expression de la luciférase. L'ensemble de ces résultats indique donc que la mutation DM1, de part son effet sur les protéines MBNL1 et CUGBP1, agit sur l'expression du transcrit ZNF37A et cela en impliquant très probablement un mécanisme lié à la stabilité des ARNm de ce gène. De façon intéressante, cette étude corrobore différents travaux antérieurs qui ont suggérés que les protéines MBNL1 et CUGBP1 pouvaient également être impliquées dans des phénomènes de stabilité des ARNm (Barreau *et al.*, 2006; Iakova *et al.*, 2004; Timchenko *et al.*, 1999).

1.3. ZNF37A et répression transcriptionnelle du récepteur à l'interleukine 13

Parallèlement à cette étude moléculaire, il nous semblait également important d'essayer de comprendre quelles pouvaient être les conséquences physiopathologiques de la modulation d'expression de ZNF37A. Tout comme pour les tests stabilité, cette partie a été réalisée en collaboration avec Morgane Gauthier, étudiante en première année de thèse au laboratoire et qui poursuit à l'heure actuelle ce travail.

Comme mentionné précédemment, la protéine ZNF37A possède les caractéristiques des membres de la famille des facteurs de transcription à domaine Krab. Ces derniers fonctionnent généralement comme répresseurs transcriptionnels notamment au travers de la formation d'un complexe multi-protéique incluant le corépresseur Kap1 (KRAB-associated protein 1). Des expériences de co-immunoprécipitation des protéines ZNF37A ou Kap1 ont permis de révéler l'interaction de ces deux protéines confirmant le rôle de répresseur transcriptionnel de ZNF37A.

Dans la mesure où ZNF37A est sous exprimé dans les cellules mutées, la recherche de ses cibles de fixations potentielles, par immunoprécipitation de la chromatine, s'est limitée à quelques promoteurs de gènes qui avaient été identifiés comme surexprimés dans les populations cellulaires DM1 par l'étude transcriptomique. Parmi ces différents promoteurs étudiés, l'analyse par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP, Chromatin ImmunoPrecipitation), a révélé une interaction du facteur ZNF37A avec une région bien spécifique du promoteur du gène codant pour la sous unité $\alpha 1$ du récepteur à l'interleukine 13 (IL13RA1). De façon intéressante, l'expression de ce récepteur a été retrouvée comme inversement proportionnelle à celle de ZNF37A dans les cultures mutées mais également dans les échantillons issus de patients DM1. Concordant avec ces observations, nous avons montré que l'extinction de l'expression de ZNF37A aboutit en une augmentation de l'expression de l'IL13RA1 dans les progénies mésenchymateuses issues des CSEh contrôles.

Le récepteur IL13RA1 forme avec la sous unité alpha du récepteur à l'IL4, un récepteur hétérodimère pouvant lié à la fois l'IL4 et l'IL13, toutes deux connues pour intervenir à des stades tardifs de la myogenèse (Horsley *et al.*, 2003; Jacquemin *et al.*, 2007). De part cette fonction biologique, il est possible de postuler que ces modulations d'expression génique pourraient influencer sur la capacité des cellules myogéniques DM1 à se différencier. Cette hypothèse est actuellement en cours d'étude au laboratoire.

Nos résultats ont permis de montrer que la mutation DM1, en affectant la fonctionnalité de MBNL1 et de CUGBP1, induisait une forte diminution de l'expression du facteur de transcription ZNF37A par un mécanisme lié à la stabilité des transcrits privilégiant l'expression d'un variant instable. L'expression insuffisante d'un tel facteur de régulation peut avoir de nombreuses répercussions différentes et affecter de nombreuses voies, comme celle de l'IL13RA1 et son implication dans la myogenèse.

L'ensemble de ces résultats a donné lieu à l'écriture d'un papier pour lequel nous attendons les derniers résultats correspondants à l'analyse des conséquences fonctionnelles de la modulation d'expression de ZNF37A sur la capacité des myoblastes DM1 à se différencier en myotubes.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats souligne la pertinence des CSEh porteuses de mutation causale comme outil cellulaire pour leur capacité à révéler la présence d'anomalies physiopathologiques à des stades précoces du développement, difficilement analysables chez l'homme. Ils illustrent également l'importance du développement de nouveaux modèles cellulaires, à la fois pour permettre une meilleure compréhension mécanistique de certaines pathologies et pour découvrir de nouveaux biomarqueurs associés à ces dernières.

A defective Krab–domain zinc finger transcription factor in myotonic dystrophy type 1

Antoine Marteyn^{1a}, Morgane Gauthier^{1a}, Karine Giraud-Triboult¹, Sophie Aubert¹, Camille Lecuyer¹, Remi Vernet¹, Jérôme Denis¹, Denis Furling², Karen Sermon³, Marc Peschanski¹, Geneviève Pietu¹ and Cécile Martinat^{1*}

¹ INSERM/UEVE UMR 861 I-STEM AFM, 91030 Evry Cedex, France;

²UMR S 787/INSERM/UPMC-Institut de Myologie, 75634 Paris Cedex 13, France;

³Dept of embryology and Genetics, Vrije Universiteit and UZ Brussel, 1090 Brussels, Belgium

* corresponding author; cmartinat@istem.genethon.fr

a: authors contribute equally to the work

Running Title : Defective zinc finger transcription factor in DM1

Key words : human embryonic stem cells, myotonic dystrophy type 1, pathological modelling, zinc finger transcription factor

ABSTRACT

Due to its singular pathological mechanisms, Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) results in genetic alterations affecting a large variety of genes that have been identified thanks to their relationship to the clinical symptoms. We have undertaken to supplement this list by using a resource-driven approach based on DM1 mutant gene-carrying human embryonic stem cells (hES) and their progenies. Using differential whole-genome analysis followed by quantitative PCR validation, fifteen yet unrevealed genes were identified misregulated as a function of the presence of the mutation. The most affected one was the transcriptional repressor zinc-finger protein, ZNF37A, the down regulation of which was confirmed in DM1 patients' tissue samples. This defect was linked to an mRNA stability alteration due to its 5' untranslated region. Loss of ZNF37A protein resulted in the increased expression of one subunit of the receptor for IL13, a cytokine known to play a role in myoblast recruitment during development and regeneration. This increased IL13RA expression leading to a defective response of DM1 myoblasts to IL13 treatment may contribute to the myogenic differentiation defect and to a longer extend to the DM1 pathogenesis.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1), the most common form of adult-onset muscular dystrophy, has a peculiar molecular basis as most, if not all of its symptoms are not directly due to a defect in the function of the mutant DMPK gene (Machuca-Tzili et al., 2005; Mahadevan et al., 1992). Abnormalities are rather introduced in the processing of a variety of genes by an indirect effect of the presence in the nucleus of the mutant DMPK RNA on proteins involved in mRNA processing (Ranum and Cooper, 2006). This results in a wide range of genetic defects and a multi-systemic symptomatology that probably affects most organs. Eleven genes demonstrating altered alternate splicing have thus been identified over the past years, on the basis of hypothesis-driven approaches seeking genes responsible for clinical symptoms. This includes, for example, the insulin receptor (IR) linked to insulin-resistance, the NMDA receptor of glutamate (NMDAR) and the Tau protein to cognitive defects, chloride channel 1 (ClC1) and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1 (Serca2) to skeletal muscle dysfunction or else cardiac troponin T (cTNT) to cardiomyopathy (Ranum and Cooper, 2006; Wheeler and Thornton, 2007).

Despite this wealth of alterations, it is widely accepted that a large number of affected genes remain to be identified. The mRNA processing proteins that are affected by the presence of the mutant RNA in the nucleus likely have many more target mRNAs with less direct or less visible symptomatic consequences. In addition, the secondarily affected genes may themselves be responsible for a cascade of transcriptional and functional events extending well beyond the known molecular defects of the disease, as recently revealed for the abnormal Nkx2.5 induction in a mouse DM1 model (Yadava et al., 2008).

In the search for molecular actors of DM1 that have remained beyond reach of the past hypothesis-driven studies, we have turned to a resource-driven approach in an attempt to fish out differentially expressed genes in cells carrying the DM1 gene by comparison with wild-

type controls. We have based our approach upon human embryonic stem cell lines (hES) derived following pre-implantation genetic diagnosis (PGD) for DM1 (Mateizel et al., 2006). Human ES cell lines indeed provide the dual advantage of the production of an unlimited amount of cells, due to their indefinite capacity at self-renewal, and of the ability to differentiate into homogenous cell populations of discrete phenotypes (Fenno et al., 2008). PGD permits, as a complement for such studies, to characterize precisely the genomic defect of the cell lines (Mateizel et al., 2006). The use of PGD-derived embryonic stem cell lines has recently revealed instrumental for the study of the fragile X molecular mechanisms (Eiges et al., 2007).

Based on this resource-driven analysis using PGD derived-DM1 hES cells, our study reveals an undescribed DM1 affected pathway: the decreased expression of a Krab-domain zinc-finger transcriptional repressor factor, named ZNF37A, which results in the increased expression of a sub unit for the receptor to a myoblast recruitment factor IL13.

RESULTS

DM1 hES cell lines and their progenies harbor nuclear mutant RNA foci and misregulated alternate splicing

Three DM1-affected hES cell lines, VUB19, VUB03, VUB24 derived from 3 independent blastocysts issued of PGD (Mateizel et al., 2006), carried a *DMPK* gene with around 450, 1000 and >2000 CTG triplet repeats, respectively (Figure S1).

As DM1 is a multisystemic disease affecting the muscular as well as nervous systems, we focused the analysis of molecular defects associated with the mutation on mesodermal and neural precursor cell populations. Mesodermal precursor cells (MPC) were obtained after 20 days of culture on gelatin and maintained with few changes up to 20 passages (Mateizel et al., 2008) (Figure S2). Neural precursor cells (NPC) were purified from neural rosettes (Perrier et al., 2004) by cell sorting using the pan neuronal surface marker NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, CD56) (Figure S2). No conspicuous alteration of cell growth or differentiation of DM1-affected hES cells was observed in comparison with control hES cells. *DMPK* mRNA was expressed in DM1-affected and control cells, independently of their differentiated status (Figure S1).

As described in DM1 patients (Mankodi et al., 2003), immunostaining combined with *in situ* hybridization demonstrated mutant *DMPK* RNA nuclear inclusions containing the RNA-binding protein MBNL1 in the three mutated cell lines, independently to their differentiated state (Figures 1A and Figure S1). Also in keeping with known molecular alteration in patients (Savkur et al., 2001), alternate splicing of the insulin receptor (IR) pre-mRNA was aberrantly regulated in mutated cells (Figure 1B), resulting in predominant expression of the lower-signaling nonmuscle isoform (IR-A).

Identification of abnormal expressed genes in mutant DM1 hES cell lines and their progenies

In order to identify new molecular defects associated to DMPK mutation, a global gene expression profiling was performed, using whole-genome DNA chips in the three cell populations available, namely hES (at the undifferentiated stage), NPC and MPC (Figure S3). Principal Component Analysis showed very similar profiles of expression for the three cell lines at the same differentiation stage indicating that effects of the DM1 mutation were likely subtle (Figure S3). All gene expression data are deposited in public database (GEO Data Bank; accession number GSE7214).

Quantitative real-time RT-PCR analyses validated the specificity of 15 altered genes in the three mutant cell lines in at least one of the stages and types of differentiation studied (Table 1). These genes, 8 down regulated and 7 overexpressed, are implicated in a large spectrum of cellular function ranging from transcription regulation to cell migration.

The transcription factor ZNF37A is specifically down expressed with DM1 mutation

We further explored the molecular mechanisms linking with DM1 the most down-regulated gene of this list *ZNF37A*, which exhibited up to a 12 fold decrease on chips and up to a 120 fold decrease in real-time RT-PCR, independently of the stage and type of cell differentiation (Table 1 and Figure S3). *ZNF37A* belongs to a cluster of zinc-finger protein genes located in the pericentromeric region of the chromosome 10p11.2-10q11.2 (Figure 2A) (Tunnacliffe et al., 1993). Gene expression analysis of this cluster confirmed the specific down expression of *ZNF37A* in DM1 cultures as none of the others displayed any differential regulation on DM1 cells (Figure 2B). Extinction levels correlated roughly with the size of the mutation (Figure 2C-E), as previously described for other molecular defects associated with DM1 in patients and animal models (Gomes-Pereira et al., 2007; Ranum and Cooper, 2006). Decreased expression was confirmed by *in situ* hybridization (Figure 2F). By

immunostaining, we confirmed these results at the protein level (Figure 3A), showing that ZNF37A is barely detected in DM1 hES-derived MPC whereas the protein can be easily detected in the nucleus of the control cultures. These results were confirmed by western blot analysis (Figure 3B). This profound gene expression defect was clearly associated to the presence of the mutant as it was also detected both in muscular or neuronal tissues from DM1 patients (Figure 2G).

DM1 mutation controls ZNF37A expression by acting on its mRNA stability through its 5'UTR

To understand the molecular mechanisms leading to the defect in ZNF37A expression, and as DM1 is correlated to an abnormal expression of two RNA-binding proteins, CUGBP1 and MBNL1, potential binding sites for these factors were searched. Interestingly, we identified a region located in the 5'UTR of ZNF37A containing (GCU) and (GCC) repeats (Figure 4A), previously shown to be a CUGBP1 binding site (Timchenko et al., 2001b; Timchenko et al., 1999). In addition to modulate splicing in the nucleus, CUGBP1 has also been shown to regulate cytoplasmic events as an mRNA destabilizing factor associated with short lived mRNA (Kim and Gorospe, 2008). We therefore measured the stability of ZNF37A transcripts following inhibition of transcription with actinomycin D. In mutated DM1 hES-derived MSC, ZNF37A mRNA degraded rapidly in comparison with control hES-derived MSC (Figure 4B). This effect is specific of ZNF37A transcripts as no difference between mutated and control MSC is observed on the stability of ZNF37B transcripts which correspond to a duplicated truncated gene of ZNF37A (Figure 4B). To validate the association between ZNF37A stability and its 5'UTR containing CUG BP1 binding sites, a luciferase reporter plasmid has been constructed in which the 474nt long region of the 5'UTR ZNF37A has been cloned upstream the luciferase gene under a CMV promoter. Transient transfection of this construct pGL4ZNF37A together with a plasmid expressing a DMPK minigene with

960 CUG repeats (Philips et al., 1998) results in a complete loss of luciferase activity. Interestingly, this effect is also observed by overexpressing either CUGBP1 or ETR3, a second member of CUGBP family (Figure 4C and Figure S4). In contrast, overexpression of MBNL1 had no effect on the luciferase activity. These effects are specific of the inserted ZNF37A 5'UTR region as no similar results are observed in absence of the insertion (Figure S4). In addition, deletion of the CUGBP binding sites rescued completely the luciferase activity (Figure 4D).

As CUGBP1 is also known to be implicated in altered splicing events in DM1 and as the 5'UTR region of ZNF37A contained intron and exon, we checked for an absence of effect of CUGBP1 on the alternate splicing of this region. As expected, by cloning this region in a B-globin minigene, no effect of overexpression of CUGBP1 was observed on the inclusion or the exclusion of this region validating that CUGBP1 controls the stability of ZNF37A mRNA (Figure S4).

Altogether, these results indicate that DM1 mutation induces ZNF37A destabilization and consequently its down expression likely through CUGBP1.

ZNF37A belongs to the Krab-domain transcriptional repressor family

The subcellular localization of the ZNF37A protein in the nucleus (see above, Figure 3) was consistent with the sequence analysis indicating that ZNF37A exhibits all the characteristics of a Krab-containing zinc-finger proteins, which generally function as a transcriptional repressor of RNA polymerase I, II and III promoters (Urrutia, 2003). Whereas the C2H2 zinc-finger motifs bind DNA, the Krab domain, found in the amino-terminal region of the protein, behaves as a transcriptional repressor domain by binding corepressor proteins such as Kap1, which has been predicted to silence gene expression by forming a facultative heterochromatin environment on a target promoter (O'Geen et al., 2007; Suzuki et al., 2008).

Accordingly, co-immunoprecipitation on nuclear fraction of control hES-derived MPC demonstrated a direct interaction of ZNF37A and Kap1 (Figure 5A).

Modulated expression of IL13 receptor $\alpha 1$ identified as a target gene for ZNF37A in association with DM1

ZNF37A likely being a transcriptional repressor, and its level of expression being decreased in DM1 cells, we postulated that reciprocally its target genes might be up-regulated in the same cells. Among the list of 7 up-regulated genes found in mutant cells, we first focused on that encoding the $\alpha 1$ chain of the receptor to IL13 (IL13RA1) because its expression levels are inversely correlating those of ZNF37A both in mutant ES cell lines, at all stages and types of differentiation and in DM1 patients' tissue samples (Figure 5B-D and Figure S4). The knockdown expression of ZNF37A by specific siRNA in control H9 hES-derived MPCs confirmed its negative control of IL13RA1 expression as it led to an increased expression of the gene (Figure 5E). In contrast, ZNF37A-directed siRNA had no effect on the expression level of eIF2S3, another gene upregulated in the mutant cells (Figure S4 and Table 1). Chromatin immunoprecipitation directed against ZNF37A followed by a PCR analysis with primers covering the entire IL13RA1 promoter revealed a potential binding site for ZNF37A that did not exist in the promoter region of eIF2S3 (Figure 5F).

Unresponsiveness of DM1 myoblasts to the myogenic recruitment factor IL13 treatment

IL13RA1 is known to be part of the common receptor for IL4 and IL13, cytokines that have been shown to be responsible for the recruitment of myoblasts and the promotion of myogenic fusion (Horsley et al., 2003; Jacquemin et al., 2007). In order to evaluate the functional consequences of the overexpression of IL13RA1 during myogenic differentiation, control and DM1 myoblasts have been treated for 6 days with IL4/IL13. As already described,

DM1 myoblasts presented a restricted ability to give rise to myotubes (Figure 6A and 6B). Whereas IL4/IL13 treatment increased the ability of control myoblasts to fusion, no effect of the treatment is observed in DM1 myoblasts (Figure 6A and 6B).

DISCUSSION

Studies of RNA toxicity in DM1 have focused on misregulated alternative splicing affecting coding regions of genes expressed in cardiac and skeletal muscle (Ranum and Cooper, 2006; Wheeler and Thornton, 2007) and the central nervous system (Jiang et al., 2004). Here, global effects of the DM1 mutation were examined on human gene expression by taking advantage of mutant gene-carrying human embryonic stem cell lines obtained from pre-implantation genetic diagnosis. The major finding of our study is the identification of two yet unrevealed molecular mechanisms by which DM1 mutation can impact gene expression. First, a profound defect in expression of the transcription factor ZNF37A was linked to altered mRNA stability due to its 5'UTR region. Second, a modulation of expression was observed in a gene downstream of ZNF37A, indicating a cascade effect. This secondary effect may bear some relevance to muscle regeneration in DM1 patients as it impacts a receptor subunit for IL13, a cytokine that controls myoblast recruitment (Jacquemin et al., 2007).

The currently accepted pathological model of DM1 holds that manifestations result from alteration of proteins involved in pre-mRNA splicing, due to their sequestration by the mutant DMPK RNA retained in the nucleus. However, recent studies showed that DM1 pathological mechanisms may not all be explained directly by such mechanisms. Osborne et al., suggested that (CUG) expansion RNA might interfere at both transcriptional and post-transcriptional level by characterizing affected genes in a DM1 transgenic mouse model expressing 250 CUG repeats in 3' UTR of the skeletal actin mRNA (Osborne et al., 2009). The authors postulated that poly(CUG) may induce post-transcriptional silencing of genes containing CAG repeats, such as *Med12* that encodes the transcriptional co-activator Mediator, mutations of which have otherwise been associated with infantile hypotonia. Parallel alteration of pre-mRNA levels and expression of some genes also pointed to an effect

of the CUG expansion on transcription. These observations were concordant with the induction of the transcription factor Nkx2.5 observed in DM1 skeletal muscle (Yadava et al., 2008). The exact mechanism of this effect is still unclear and could be attributed, at least partially, to the leaching of transcription factors from chromatin and their sequestration by the mutant DMPK RNA (Ebralidze et al., 2004).

The DM1-specific decreased expression of *ZNF37A* linked to a defective stability due to its 5'UTR that was observed in the present study reinforces this notion that DM1 RNA toxicity provokes a broader spectrum of action than previously demonstrated. As in this case, the modulation lies in the non coding region of the mRNA, this extends potentially the impact of the DM1 mutation on mRNA stability or translational read out (Hughes, 2006). Our results demonstrate that the expression of *ZNF37A* is controlled by CUGBP1. The functions of this protein as well as MBNL1, another RNA-binding protein, are found to be profoundly affected in DM1 patients cells. MBNL1 associates with the repeat-containing mRNA and is confined to nuclear foci (Mankodi et al., 2001), whereas CUGBP1 is overexpressed and hyperphosphorylated in the nucleus (Kuyumcu-Martinez et al., 2007). There is also evidence that CUGBP1 may be depleted from the cytoplasm (Roberts et al., 1997). Interestingly CUGBP1 and MBNL1 are both splicing regulators that play antagonistic roles in splice selection. Consistent with this, most of the pathological studies concerning DM1 have focused on the identification of alternate splicing defects (Mulders et al.). However, several studies have indicated that cytoplasmic events regulated by CUGBP1, in addition to its nuclear splicing function, might contribute to DM1 pathology. Specifically, CUGBP1 binds to the 5'UTR of *C/EBPb* and *p21* mRNAs and affects translation efficiency (Timchenko et al., 2001a; Timchenko et al., 1999). CUGBP1 has also recently been implicated as an mRNA stabilizing factor associated with short lived mRNAs (Vlasova et al., 2008), and is involved of in the decay of *TNF* mRNA in muscle cells (Zhang et al., 2008). Whereas the exact

mechanism (translation efficiency vs. stability) by which CUG-BP1 regulates the expression of *ZNF37A* needs to be further explored, our results are consistent with the concept that the cytoplasmic function of CUGBP1 has a more extensive impact on DM1 pathogenesis than previously thought.

As shown by its sequence, its nuclear localization and its interaction with the protein Kap1, *ZNF37A* belongs to the Krüppel-associated box (KRAB)-containing zinc finger proteins family, that have been so far characterized by a transcriptional repressor activity (Abrink et al., 2001; Urrutia, 2003). Involvement of a zinc-finger transcription factor in DM1 is the more interesting that it calls for a comparison with DM2, another myotonic dystrophy characterized by CCUG mRNA expansions (Liquori et al., 2001) in another member of the same family *ZNF9*. The clinical analogies between DM1 and DM2 have led to the suggestion of a common trans-acting mechanism with depletion of similar transcription factors (Cho and Tapscott, 2007). The striking observation that haploinsufficiency for *Znf9* is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy reinforces this notion (Chen et al., 2007). Though tentatively at this stage, it is therefore tempting to postulate that a common requirement for transcription factors in tissues expressing the mutant DMPK may account in part for some of the multisystemic symptomatology of DM1 (e.g., myotonia, myopathy, diabetes, cognitive impairments). In order to address that issue, it will be interesting to undertake a systematic search for target genes impacted by of the loss of *ZNF37A* expression in DM1.

Based on the hypothesis that, in DM1 cells, the lack of expression of *ZNF37A* might result in the overexpression of its target genes, we associated the defect to an independently observed increased expression of *IL13RA1*. This gene encodes a receptor subunit that participates with IL4RA to the heterodimeric receptor for the IL4 and IL13 cytokines (Wills-Karp and Finkelman, 2008). It is interesting to mention that both of these cytokines play an

important role for cell fusion nascent myotubes during development and regeneration (Horsley et al., 2003; Jacquemin et al., 2007; Lafreniere et al., 2006). *IL13RA1* expression also increases soon after muscle injury suggesting a role of this receptor during muscle regeneration (Goetsch et al., 2003). Increased expression of *IL13RA1* in DM1 cells may, therefore, bear some significance for either myogenesis or regeneration (Gomes-Pereira et al., 2007; Mankodi et al., 2000; Mastroyiannopoulos et al., 2008; Thornell et al., 2009). Consistent, our results indicate that DM1 myoblasts do not respond properly to IL13/IL4 treatment in term of myotubes formation. The exact mechanism by which the increased expression of *IL13RA1* in DM1 might be correlated to this phenotype needs to be further examined. However, it is interesting to note that, as previously mentioned, CUGBP1 regulates the translation of mRNA coding for an inhibitor of the cell cycle, p21, which is an important regulator of skeletal muscle differentiation by triggering the cell-cycle exit of myoblasts {Timchenko, 2001 #346} {Zhang, 1999 #520}. Thus, our results extend the pathological function of CUGBP1 for the myogenesis or regeneration in DM1.

Most previous analyses of DM1 pathological mechanisms aimed at associating clinical symptoms and alteration of the processing of specific candidate proteins. These hypothesis-driven studies have unavoidably left out genes, the defect of which could not be directly linked to symptoms. We have started to provide a complementary list of genes that appear to be specifically modified by the presence of DM1 mutation by combining the use of DM1-mutant hES cells-derived progenies and a global gene expression profiling. Although validation of the exact mechanisms by which DM1 impacts these genes of this first list has yet to be brought, as well as the effect of their abnormal expression on cell metabolism must be defined, these genes are candidates for new pathological pathways associated to DM1. They may also eventually provide additional markers for monitoring disease status and therapeutic response. By focusing on one of these new candidate genes, the present study brings a proof-

of-concept for the added value of such a resource-driven approach based upon gene-carrying pluripotent stem cell lines. Each monogenic disease has its own pathological mechanisms and one may not extrapolate simply the success of this approach in DM1 to others. Nevertheless, our results plead for a systematic search for pathological mechanisms using the new biological resource offered by mutant gene-carrying pluripotent stem cell lines, whether they be of embryonic origin or reprogrammed from patients' cells.

MATERIELS AND METHODS

Human ES cell culture

Mutants hES cell line (VUB03_DM, XX, passages p70-p90; VUB19_DM, XY, passages p60-70; and VUB24_DM; XX, passages p30-40, derived in AZ-VUB) and wild type human ES cells (SA-01, XY, passages 20–80; Cellartis; and H9, XX, passages 40–60; WiCell Research Institute; VUB01, XY, passages p80-90) were maintained on a layer of mitotically inactivated STO feeders (ATCC) and were cultured in as previously described (Lefort et al., 2008).

DM1 tissues

All adult myotubes and myoblastes were obtained from quadriceps muscles biopsies (kindly gift by Dr. D. Furling). Post-mortem brains RNA (kindly gift by Dr.A. Delacourte) result from frontal cortex biopsies of six patients (three DM1 (DS61; GOS4; BAS3) and three wild type (BA72; D165B; HO60)). The fetal brains RNA (kindly gift by Dr. G. Gourdon) were derived from fetuses aged from 12 to 25 amenorrhea weeks. DM1 samples were affected to different degrees (97-1500 CTG repeats).

Real Time - Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Agilent DNA Chips analysis

Total RNA from cells was isolated by “RNeasy Mini Protocol” (Quiagen). cDNA was synthesized by using SuperScript (Invitrogen). RT-PCRs were optimized to determine the linear amplification range by using a Chromo4 Real-Time system (Bio-Rad) with Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). For Agilent Chips analysis, PCR products were quantified using the DNA 1000 kit for the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, France) according to the manufacturer's protocol.

Plasmids

The 5'UTR region of ZNF37A, constituted by the last 122bp of the first intron, the entirely genomic sequence from the second exon to the third exon (separated by the second intron),

and the beginning of the third intron (109bp), was amplified by PCR from hES cDNA using the primers described in supplementary table 1. Forward primer contains a BamH1 sequence in 5' whereas the reverse a Xba1 sequence. This PCR product was cloned using the "Zero blunt TOPO PCR cloning kit" (Invitrogen). Insertion into the 4.11.12 plasmid was performed using BamH1/Xba1 restriction sites. The insert was purified using "NucleoSpin Extract II" kit (Macherey-Nagel), and ligation by using Quick Ligation™ Kit procedure (Biolabs; Ozyme). The ZNF37A 5'UTR was cloned, with HindIII restriction sites, in luciferase plasmid, modified from pGL4.82 (Promega) with the Cytomegalovirus CMV promoter. All plasmids were produced following NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) protocol.

Luciferase assay

HEK293 cells were plated at 2.5×10^4 cells/cm² in 96-well plate in Alpha MEM medium supplemented with 10% SVF (Hyclone) and 1% Glutamax, 1% nonessential amino acids and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). 24hours after plating, the cells were co-transfected with 100ng of pGL4-ZNF37A and 100ng of (CTG)₉₆₀ plasmid /CUGBP1 plasmids /ETR3 plasmids /MBNL1 plasmids in OptiMEM medium by using Lipofectamine™ LTX Reagent (Invitrogen) . 48h after transfection, a luciferase assay is perform following Enduren™ Live Cell Substrate (Promega) protocol and in parallel for the normalization of luciferase signal intensity, a Cell Titer Glo® Luminescent Cell Viability Assay was done (Promega).

Transient siRNA knockdown.

The sequences targeted by chemically synthesized siRNAs in transient knockdown experiments were as follows: Mbnl1, 5'-AAC ACT GGA AGT ATG TAG AGA-3'; Hs_ZNF37A_7 HP siRNA (Qiagen), and Silencer® Negative Control siRNA (Ambion, Applied Biosystems). MPC cells were plated at 5×10^4 cells per well (70-80% confluency in 24-well plate) and were transfected the day after with 10-40 nmol siRNA in OptiMEM medium by using LipoRNAiMax (Invitrogen).

Protein extracts, co-immunoprecipitation and Western Blot

Nuclear and cytoplasmic proteins were isolated from hES-derived MPC using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kit (Pierce). 15 ug of proteins, quantified by Pierce BCA Protein Assay kit (Pierce), were loaded on a 4-12% gradient (Invitrogen). Western blotting was performed as described in (Staropoli et al., 2003) using monoclonal antibody to ZNF37A (R&D systems, 1/500), polyclonal anti-ZNF37A (Abnova, 1/1000), monoclonal antibody to β -actin (Sigma, 1/500) and monoclonal anti-H3, CT, pan A3S (Millipore, 1/2000).

For co-immunoprecipitation, nuclear extracts were prepared and incubated with monoclonal antibodies to ZNF37A (R&D System, 10 μ g), to Kap1 (Abcam, 5 μ g) and to Isl2 (DSBK bank, 5 μ g). Immune complexes were then processed as described in (Staropoli et al., 2003).

Immunocytochemistry and *in situ* hybridization

Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and were incubated with the monoclonal antibody against ZNF37A (R&D System, 1/500) at 4°C for 12 h. Appropriate FITC-labeled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used. *In situ* hybridization was performed by using Dig-labeled ZNF37A probes as described in (Martinat et al., 2006). Monoclonal Cy3 conjugated anti-Dig was used (Roche, 1/100). Images were captured using a fluorescent Zeiss microscope.

Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation analyses were carried out as described (Dahl and Collas, 2008; Nelson et al., 2006). Briefly, genomic DNA and proteins were cross-linked by formaldehyde (1% final) and quenched with glycine 1M. Cells were sonicated 8 times to generate 100-1000bp DNA fragments. Before addition of antibody, 100ul of lysate was saved as the input sample. Either anti-acetyl H3, CT, pan A3S (Millipore, 5ug), monoclonal anti-

ZNF37A (R&D system, 5ug), monoclonal anti-Isl2 or MAP2 (DSBH bank, 5ug) were incubated with lysates overnight at 4°C. Immune complexes were purified using Dynead beads (Invitrogen) and eluted at 100°C for 10 min. DNA was extracted using purification columns (Nalgene) and quantitative PCR were carried out and analysed as described in (Martinat et al., 2006) using primers described in supplementary table 1.

Myoblasts differentiation and IL13/IL4 treatment

Myoblasts were plated at 8×10^4 cells/cm² in 12-well plate in DMEM/F10 (Invitrogen) supplemented with 20% SVF (Eurobio) and 0,1% penicillin-streptomycin (Gibco). When culture are 90% confluent, cells were switch in 2% serum medium to committed differentiation. Cells were treated at day 0 and 4 of differentiation with 50ng/ml of IL13/IL4 (25 /25) (R&D systems). At day 6, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and immunocytochemistry was perform with anti-Desmin (1/50^e) (R&D systems), anti-MF20 (1/200^e) (DSHB) antibodies and Dapi (1/10000^e) for nuclei. Index fusion was calculated with the number of MF20 positives cells with more than 3 nuclei, over the total number of MF20 positives cells.

Abrink, M., Ortiz, J. A., Mark, C., Sanchez, C., Looman, C., Hellman, L., Chambon, P., and Losson, R. (2001). Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1422-1426.

Charlet, B. N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., and Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 10, 45-53.

Chen, W., Wang, Y., Abe, Y., Cheney, L., Udd, B., and Li, Y. P. (2007). Haploinsufficiency for Znf9 in Znf9^{+/-} mice is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy. *J Mol Biol* 368, 8-17.

Cho, D. H., and Tapscott, S. J. (2007). Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim Biophys Acta* 1772, 195-204.

Dahl, J. A., and Collas, P. (2008). A rapid micro chromatin immunoprecipitation assay (microChIP). *Nat Protoc* 3, 1032-1045.

Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidse, K., and Junghans, R. P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 383-387.

Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., and Ben-Yosef, D. (2007). Developmental Study of Fragile X Syndrome Using Human Embryonic Stem Cells Derived from Preimplantation Genetically Diagnosed Embryos. *Cell Stem Cell* 1, 568-577.

Fenno, L., Ptaszek, L., and Cowan, C. (2008). Human embryonic stem cells: emerging technologies and practical applications. *Curr Opin Genet Dev*, 324-329.

Goetsch, S. C., Hawke, T. J., Gallardo, T. D., Richardson, J. A., and Garry, D. J. (2003). Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics* 14, 261-271.

Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., and Gourdon, G. (2007). CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet* 3, e52.

Ho, T. H., Charlet, B. N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., and Cooper, T. A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *Embo J* 23, 3103-3112.

Horsley, V., Jansen, K. M., Mills, S. T., and Pavlath, G. K. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113, 483-494.

Hughes, T. A. (2006). Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet* 22, 119-122.

Jacquemin, V., Butler-Browne, G. S., Furling, D., and Mouly, V. (2007). IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes. *J Cell Sci* 120, 670-681.

Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., and Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 13, 3079-3088.

Kim, H. H., and Gorospe, M. (2008). GU-rich RNA: expanding CUGBP1 function, broadening mRNA turnover. *Mol Cell* 29, 151-152.

Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G. S., and Cooper, T. A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* 28, 68-78.

Lafreniere, J. F., Mills, P., Bouchentouf, M., and Tremblay, J. P. (2006). Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 312, 1127-1141.

Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A. L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* 26, 1364-1366.

Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864-867.

Machuca-Tzili, L., Brook, D., and Hilton-Jones, D. (2005). Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32, 1-18.

Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., and et al. (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255.

Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C. A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773.

Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., Cannon, S. C., and Thornton, C. A. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 10, 35-44.

Mankodi, A., Teng-Umnuay, P., Krym, M., Henderson, D., Swanson, M., and Thornton, C. A. (2003). Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol* 54, 760-768.

Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* 10, 2165-2170.

Martinat, C., Bacci, J. J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W. B., Newman, A. H., Cha, J. H., Gether, U., Wang, H., and Abeliovich, A. (2006). Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2874-2879.

Mastroyiannopoulos, N. P., Chrysanthou, E., Kyriakides, T. C., Uney, J. B., Mahadevan, M. S., and Phylactou, L. A. (2008). The effect of myotonic dystrophy transcript levels and location on muscle differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 526-531.

Mateizel, I., De Becker, A., Van de Velde, H., De Rycke, M., Van Steirteghem, A., Cornelissen, R., Van der Elst, J., Liebaers, I., Van Riet, I., and Sermon, K. (2008). Efficient differentiation of human embryonic stem cells into a homogeneous population of osteoprogenitor-like cells. *Reprod Biomed Online* 16, 741-753.

Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 21, 503-511.

Mulders, S. A., van Engelen, B. G., Wieringa, B., and Wansink, D. G. Molecular therapy in myotonic dystrophy: focus on RNA gain-of-function. *Hum Mol Genet* 19, R90-97.

Nelson, J. D., Denisenko, O., and Bomsztyk, K. (2006). Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc* 1, 179-185.

O'Geen, H., Squazzo, S. L., Iyengar, S., Blahnik, K., Rinn, J. L., Chang, H. Y., Green, R., and Farnham, P. J. (2007). Genome-wide analysis of KAP1 binding suggests autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet* 3, e89.

Osborne, R. J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J. R., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*.

Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-12548.

Philips, A. V., Timchenko, L. T., and Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741.

Ranum, L. P., and Cooper, T. A. (2006). RNA-Mediated Neuromuscular Disorders. *Annu Rev Neurosci*.

Roberts, R., Timchenko, N. A., Miller, J. W., Reddy, S., Caskey, C. T., Swanson, M. S., and Timchenko, L. T. (1997). Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)n

triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13221-13226.

Savkur, R. S., Philips, A. V., and Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29, 40-47.

Staropoli, J. F., McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E., and Abeliovich, A. (2003). Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 37, 735-749.

Suzuki, C., Murakumo, Y., Kawase, Y., Sato, T., Morinaga, T., Fukuda, N., Enomoto, A., Ichihara, M., and Takahashi, M. (2008). A novel GDNF-inducible gene, BMZF3, encodes a transcriptional repressor associated with KAP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 226-232.

Thornell, L. E., Lindstrom, M., Renault, V., Klein, A., Mouly, V., Ansved, T., Butler-Browne, G., and Furling, D. (2009). Satellite Cell Dysfunction Contributes To The Progressive Muscle Atrophy In Myotonic Dystrophy Type 1. *Neuropathol Appl Neurobiol*.

Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., and Timchenko, L. T. (2001a). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 276, 7820-7826.

Timchenko, N. A., Iakova, P., Cai, Z. J., Smith, J. R., and Timchenko, L. T. (2001b). Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol* 21, 6927-6938.

Timchenko, N. A., Welm, A. L., Lu, X., and Timchenko, L. T. (1999). CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res* 27, 4517-4525.

Tunnacliffe, A., Liu, L., Moore, J. K., Leversha, M. A., Jackson, M. S., Papi, L., Ferguson-Smith, M. A., Thiesen, H. J., and Ponder, B. A. (1993). Duplicated KOX zinc finger gene clusters flank the centromere of human chromosome 10: evidence for a pericentric inversion during primate evolution. *Nucleic Acids Res* 21, 1409-1417.

Urrutia, R. (2003). KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol* 4, 231.

Vlasova, I. A., Tahoe, N. M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J. R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C. S., Bitterman, P. B., and Bohjanen, P. R. (2008). Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell* 29, 263-270.

Wheeler, T. M., and Thornton, C. A. (2007). Myotonic dystrophy: RNA-mediated muscle disease. *Curr Opin Neurol* 20, 572-576.

Wills-Karp, M., and Finkelman, F. D. (2008). Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal* 1, pe55.

Yadava, R. S., Frenzel-McCardell, C. D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A. L., Puymirat, J., Thornton, C. A., Prall, O. W., Harvey, R. P., and Mahadevan, M. S. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet* 40, 61-68.

Zhang, L., Lee, J., Wilusz, J., and Wilusz, C. (2008). The RNA-binding Protein CUGBP1 Regulates Stability of Tumor Necrosis Factor mRNA in Muscle Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 283, 22457-22463.

LEGENDS

Figure 1: DM1-hES cell lines and their neural and mesenchymal progenies reproduce the main cellular and molecular features of DM1. (A) *In situ* hybridization combined with an immunostaining indicate the nuclear colocalization of mutant mRNA (red) and endogenous MBNL1 (green) in the three mutant hES-derived MPC cells (VUB03_DM, VUB24_DM). Scale bar = 50µm. Nuclei were stained with Dapi. (B) Alternate splicing of IR exon 11 in hES derived- MPC. The IR-B and IR-A bands correspond to the inclusion and the exclusion of exon 11, respectively. The ratio IR-A/IR-B isoforms was quantified using Agilent 2100 bioanalyzer. Data are presented as mean ± SEM (n= 4) and were analysed using a t test (ANOVA). * p< 0.05, ** p< 0.0001.

Figure 2: Specific down expression of ZNF37A in DM1 mutated cell lines and in DM1 affected tissues. (A) *ZNF37A* belongs to a genes cluster localized on the pericentromeric part of the chromosome 10. (B) Quantitative RT-PCR analysis indicates the specific down expression of *ZNF37A* in the mutated cell line VUB03_DM, in undifferentiated hES, NPC and MPC. (C-E) Quantitative real-time RT-PCR analysis of *ZNF37A* expression in the three DM1 hES cell lines, independently of their differentiated state (undifferentiated hES, NPC and MPC). Data (n=3) are presented as values of the control VUB01 cell line (white bars) or H9 cell lines (black bars) after normalization with cyclophilin levels. (F) *In situ* hybridization using a Dig-labelled *ZNF37A* probe confirms *ZNF37A* decreased expression in DM1 hES-derived MPC (VUB03_DM) as compared with control hES-derived MPC (VUB01). Nuclei are stained with Dapi. Scale bar = 100µm. (G) *ZNF37A* expression defect is also observed in

DM1 affected muscular and cerebral tissues using real-time RT-PCR (results are normalized with the average of control samples).

Figure 3: Down expression of ZNF37A at the protein level in DM1 hES-derived MPC.

(A) Immunostaining directed against ZNF37A on hES-derived MPC indicates its nuclear localization in control cultures (H9) and confirmed its down expression at the protein level in DM1 hES-derived MPC (VUB03_DM). Nuclei are stained with Dapi. Bar scale = 20µm. (B) Western blot analysis confirmed the specific nuclear localization of ZNF37A as well as its down expression in DM1 hES-derived MPC (VUB03_DM and VUB24_DM) in comparison to the wild type cell line (H9). H3 PAN was used as a nuclear positive fraction control; Actin was used as a loading control. (C) Quantification of level of ZNF37A protein expression after western blot by using ImageJ software. Data, obtained in triplicate, were normalized with the level of actin. Similar results were obtained with 10, 5, 2.5, 1.25 µg of proteins loaded. Data are presented as the mean ± SEM (n= 3) and were analysed with a t test ANOVA, * p< 0.0001.

Figure 4: RNA-binding proteins regulate ZNF37A expression through the modulation of its 5'UTR.

(A) Schematic *ZNF37A* organisation and CUGBP1 potential binding region in the 5'UTR (in grey). (B) Quantitative real-time RT-PCR analysis after actinomycin treatment (5µg/ml) on Ctrl hES-derived MPC and DM1 hES-derived MPC. ZNF37A transcripts are less stable in DM1 hES-derived MPC than in Ctrl-hES derived MPC whereas for ZNF37B transcripts, no differences were observed. HEK293 cells were cotransfected with (C) pGL4-ZNF37A or (D) pGL4-ZNF37A-CUGBP1 mutated and plasmids coding for 960 CTG repeats (CTG 960) or

RNA-binding protein (CUGBP1, ETR3, MBNL1). Forty-eight hours after transfection luciferase analysis was performed. Data are presented as mean \pm SD (n= 6) and were analysed with a t test ANOVA, * p<0.0001.

Figure 5: Potential regulation of IL13RA1 expression by the ZNF37A.

(A) ZNF37A and Kap1 proteins co-immunoprecipitate in control H9-hES-derived MPC. Cellular lysates were immunoprecipitated with anti-ZNF37A or anti-Kap1 and probed by western blotting as indicated. (B-C) Correlation between ZNF37A (grey box) and IL13RA1 (white box) expression quantified by real-time RT-PCR in DM1 hES cell lines independently to their differentiated states, undifferentiated hES, NPC and MPC. Results obtained with two DM1 VUB03_DM hES (B) and DM1 VUB24_DM hES (C) are normalized with the control cell line H9 (n= 3). (D) Correlation between ZNF37A (grey box) and IL13RA1 (white box) expression quantified by real-time RT-PCR in DM1 myotubes. Data are presented after normalization with the mean value obtained with control myotubes samples (n=3). (E) ZNF37A specific siRNA induces a downexpression of ZNF37A associated to IL13RA1 up-expression. Results were obtained at different times after transfection on control H9 hES-derived MPC and analysed by real-time RT-PCR. Data are presented as values of control siRNA after normalization with Cyclophilin (n=3). (F) Chromatin immunoprecipitation assays were performed on control H9 hES-derived MPC lysates by using an antibody to ZNF37A or to negative control MAP2 followed by a quantitative PCR for IL13RA1 promoter. Example of results obtained with 2 primers pairs located differently on the IL13RA1 promoter. Data are expressed as percent precipitation relative to input (mean values \pm SEM, n=4).

Figure 6: Unlike the control, DM1 myoblasts do not respond to IL13/IL4.

(A) Immunohistology of DM1 and Control myotubes at 6 days of differentiation treated or not treated with IL13/IL4 (50ng/ml). Desmin shows muscular population, MF20 the differentiated

cells and Dapi labelled nuclei. Scale bar represented 50 μ m. (B) Index fusion was calculated as the number of myotubes with more than 3 nuclei over the total number of myotubes showing the maturation of myotubes. Data are presented as mean \pm SD (n= 2) and were analysed with a t test ANOVA, * p<0.0001.

Acknowledgements:

We thank Jack Puymirat at CHUQ, Quebec, Canada, Denis Furling, Gillian Butler-Brown and Vincent Mouly, UMR S 787 Paris, France for helpful discussions, Genevieve Gourdon INSERM U781, Paris, France for performing the CTG repeat analysis and the platform of Institut Curie, Paris for performing the DNA chips analysis, Nicolas Charlet, INSERM U596, Ullkirch, France for providing minigene plasmids and Noel Buckley, King's London College, UK for Chromatin immunoprecipitation analysis.

This work was supported by the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Association Française contre les Myopathies (AFM), MediCen (IngeCell program) and Genopole. AM had a fellowship from the Regional Council.

Figure 1- Marteyn et al.

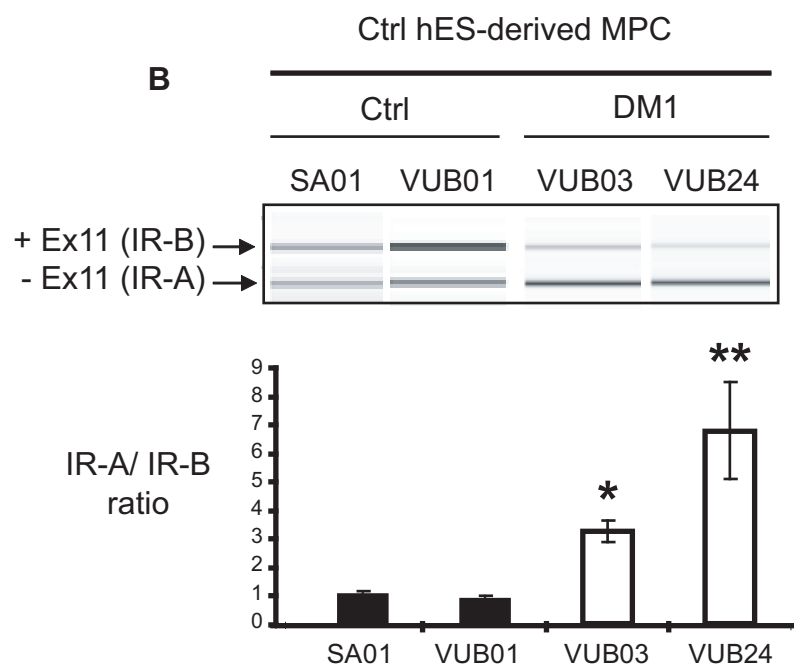
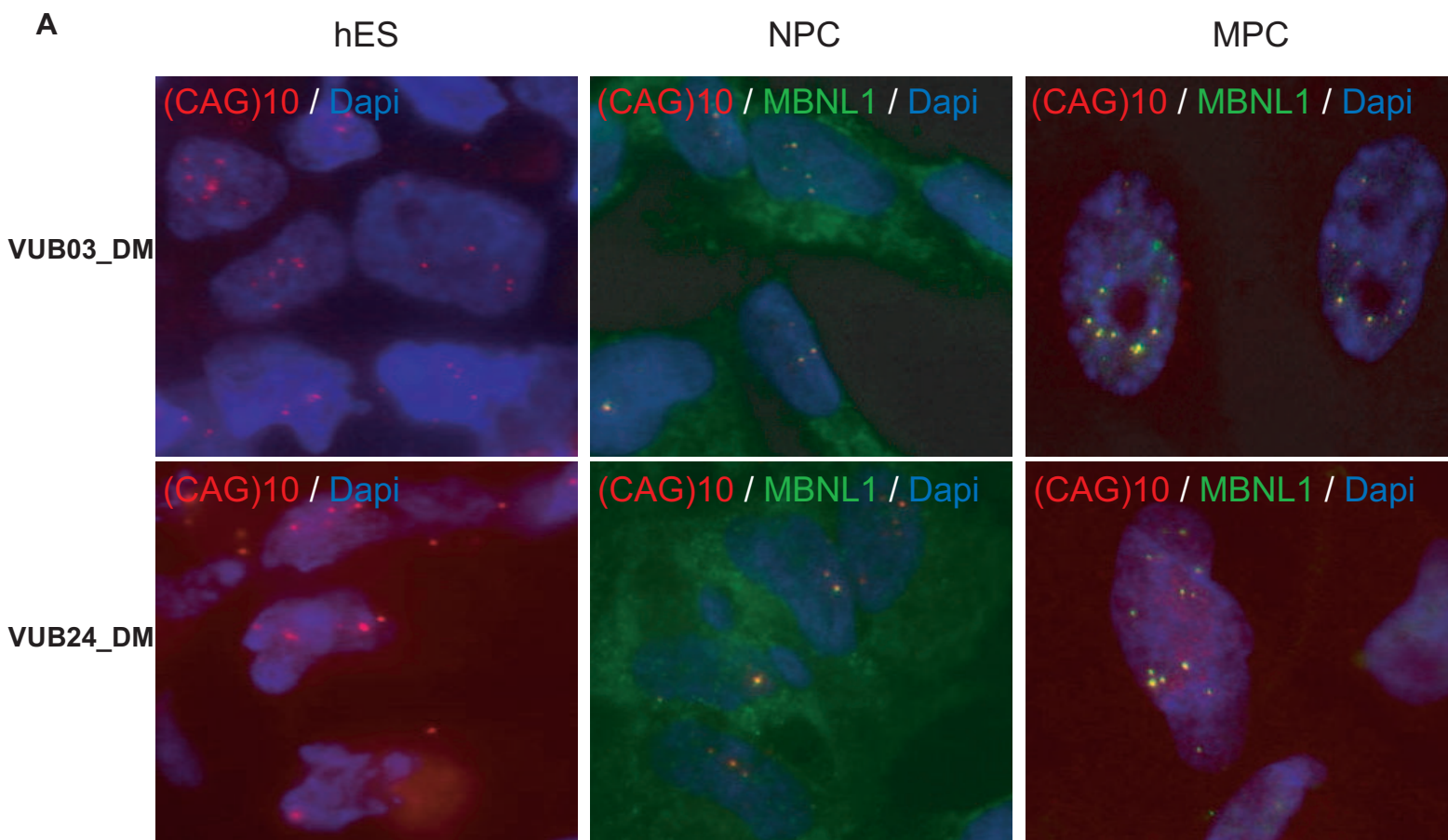


Figure 2- Marteyn et al.

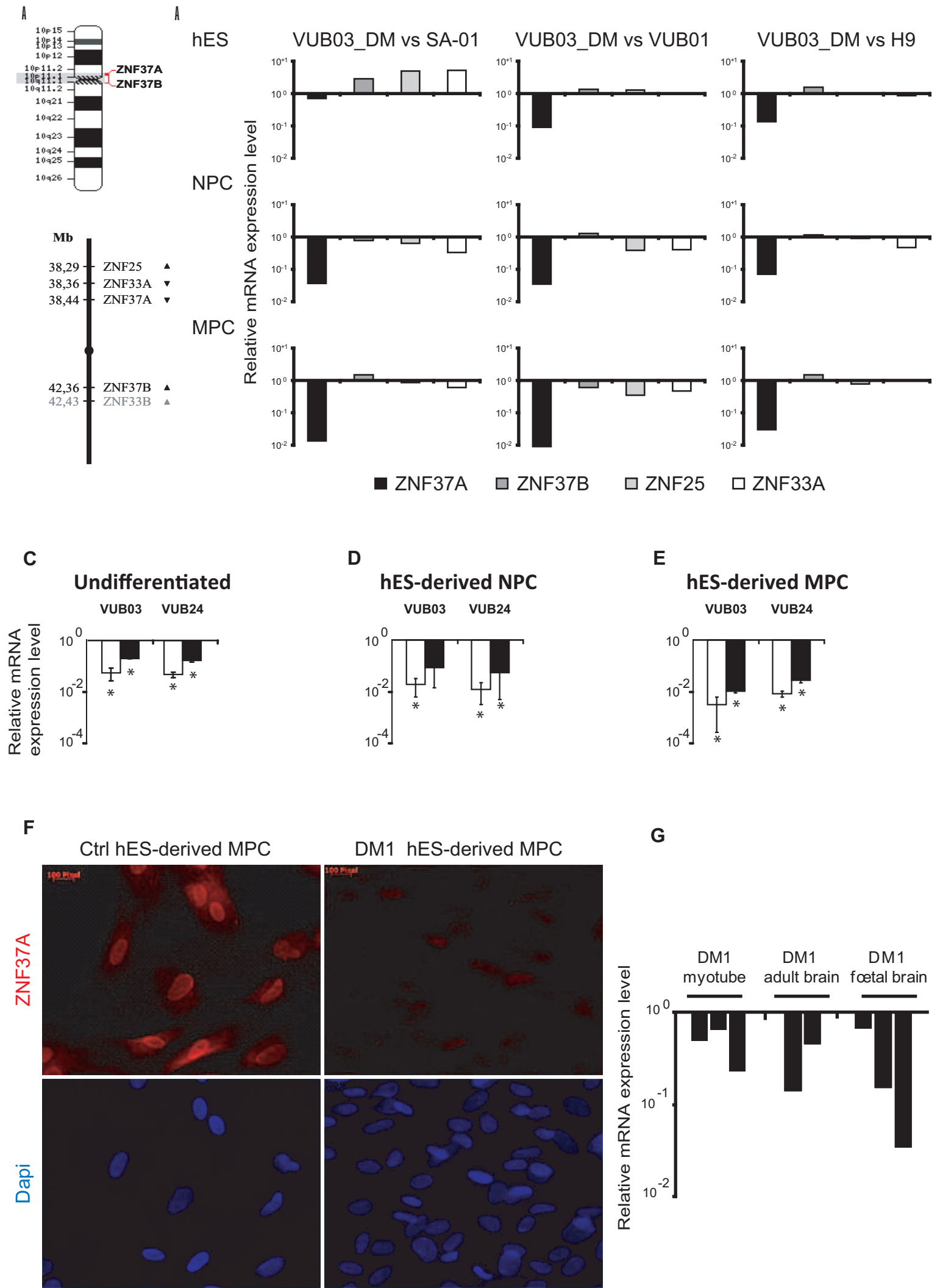


Figure 3- Marteyn et al.

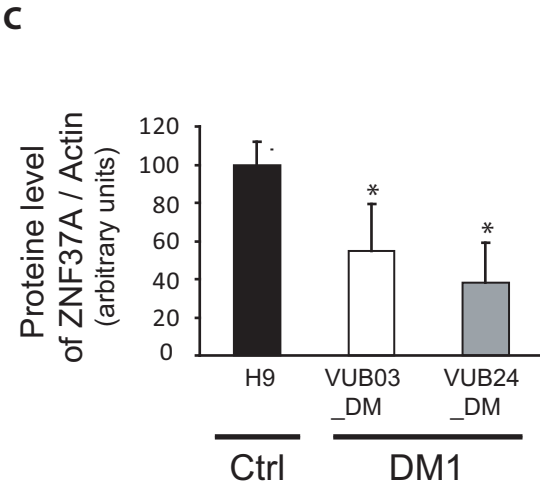
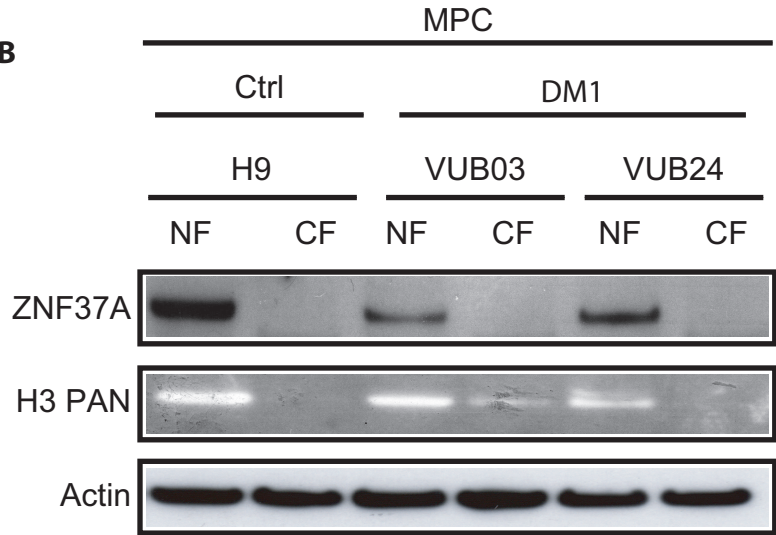
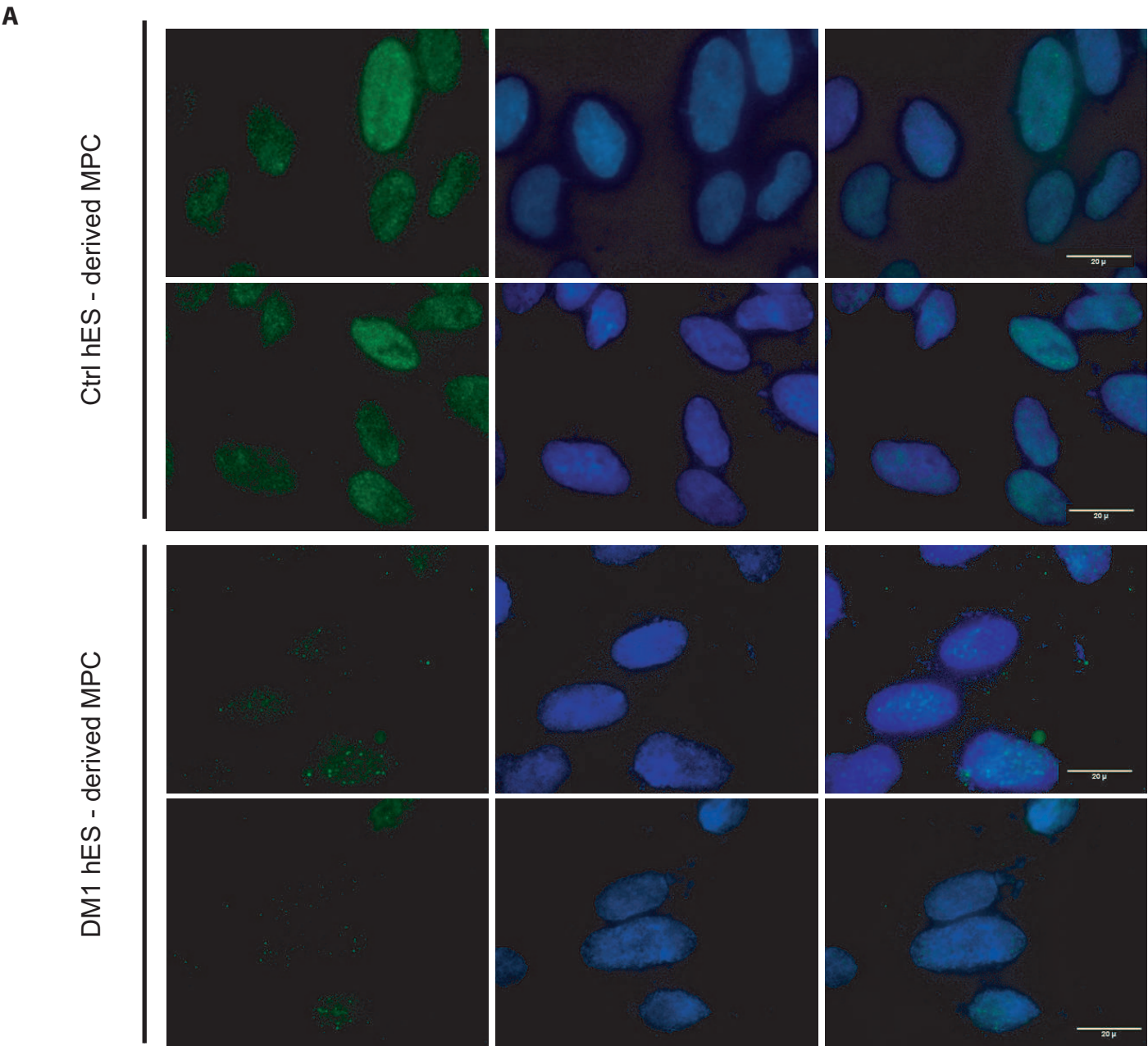


Figure 4 -Marteyn et al.

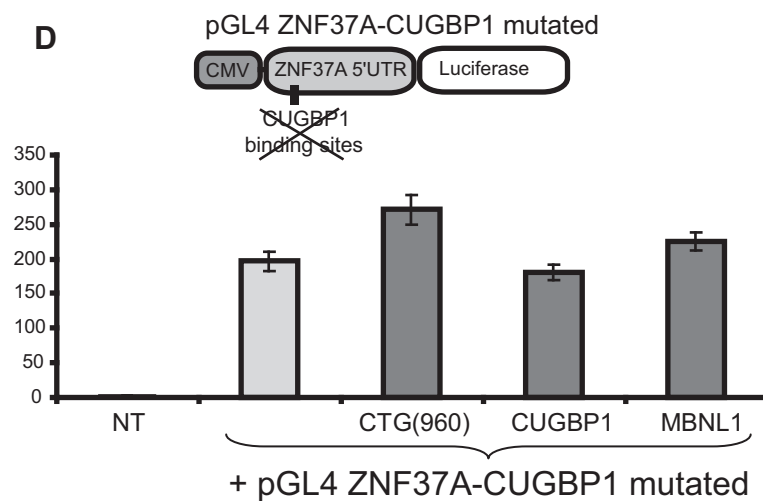
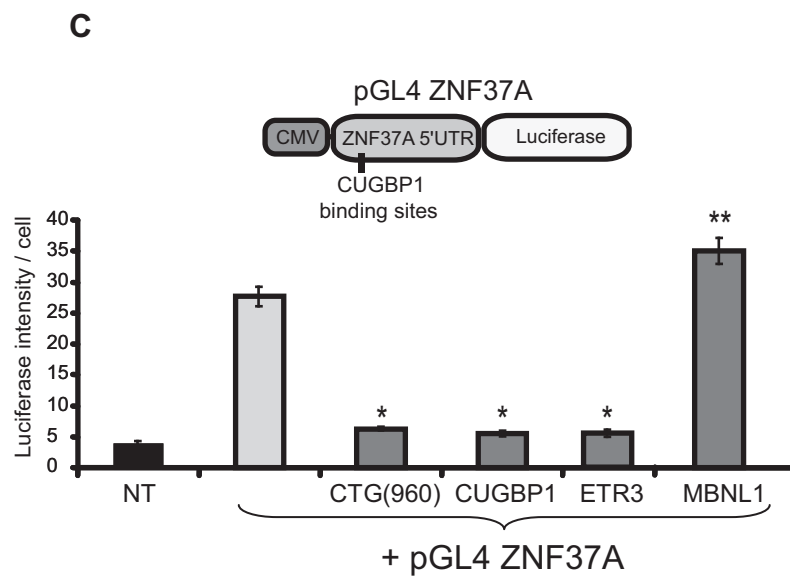
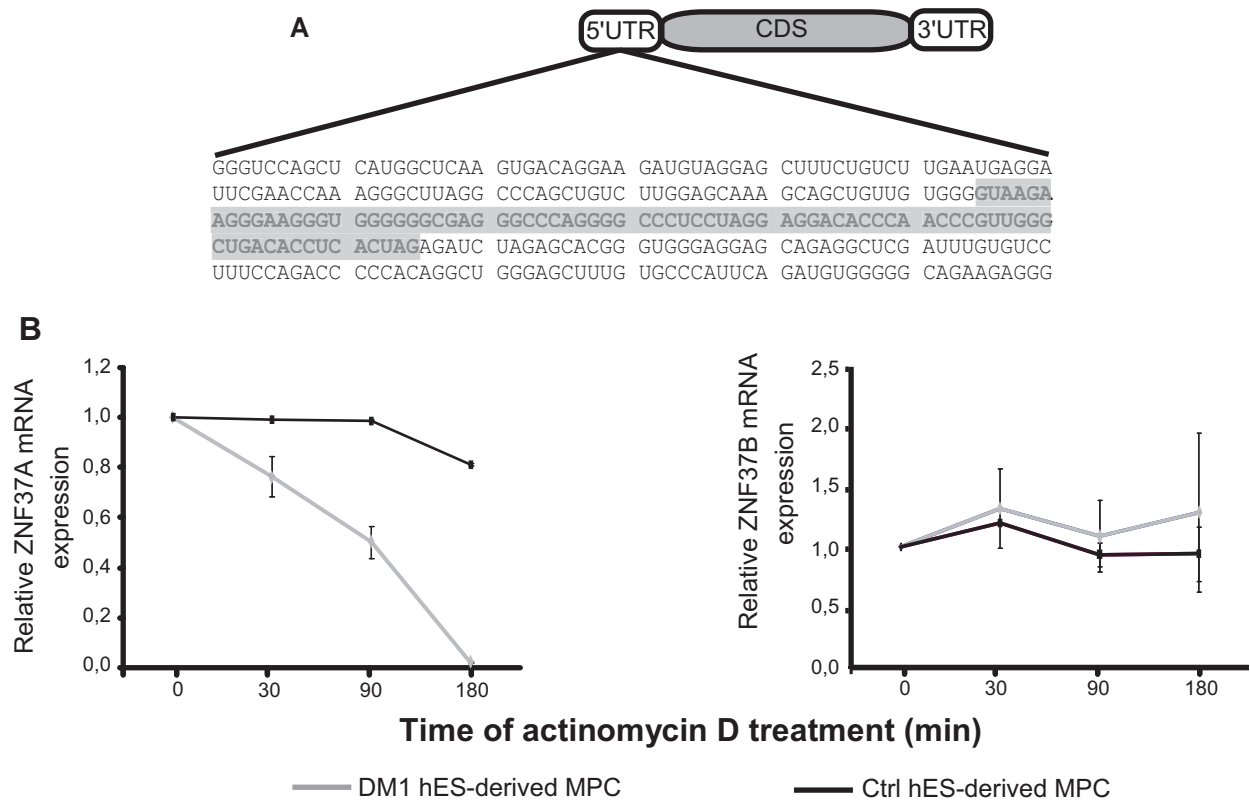


Figure 5- Marteyn et al.

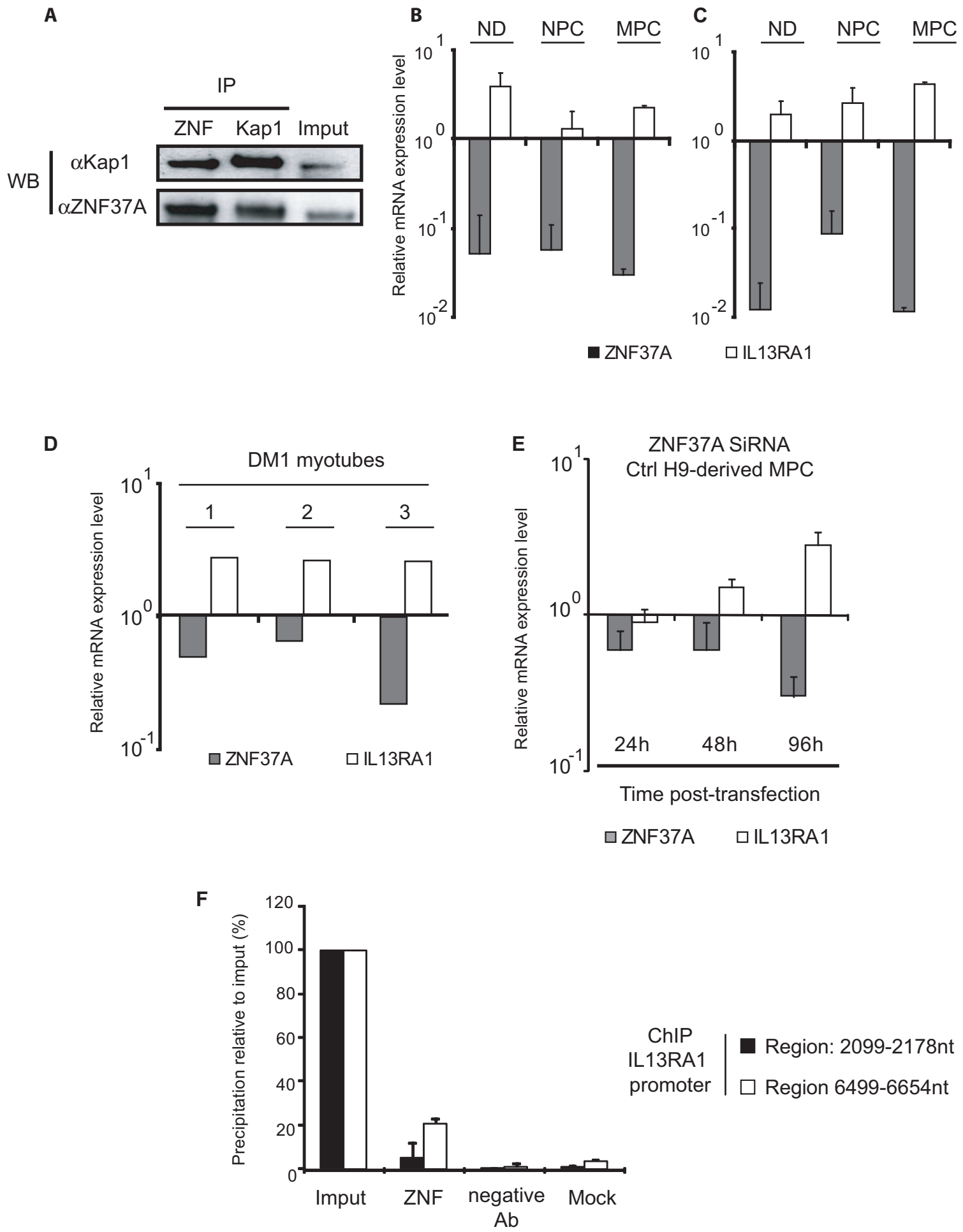
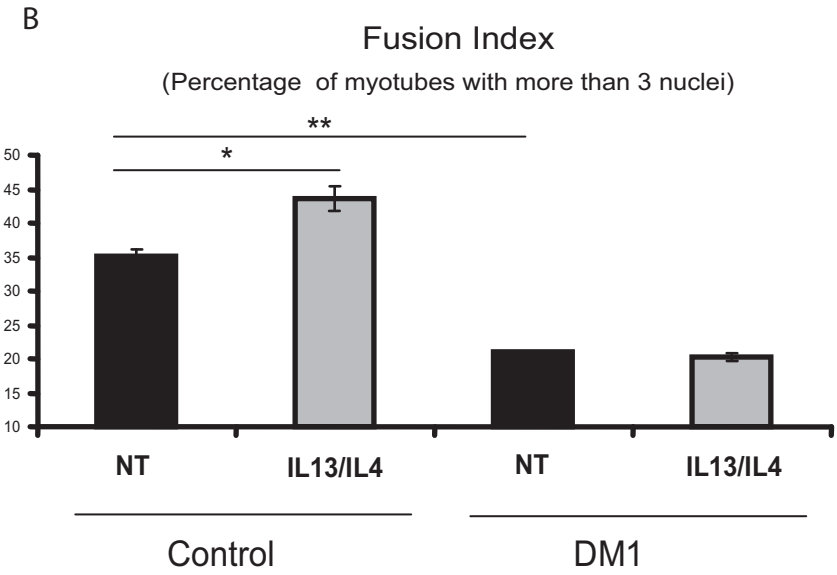
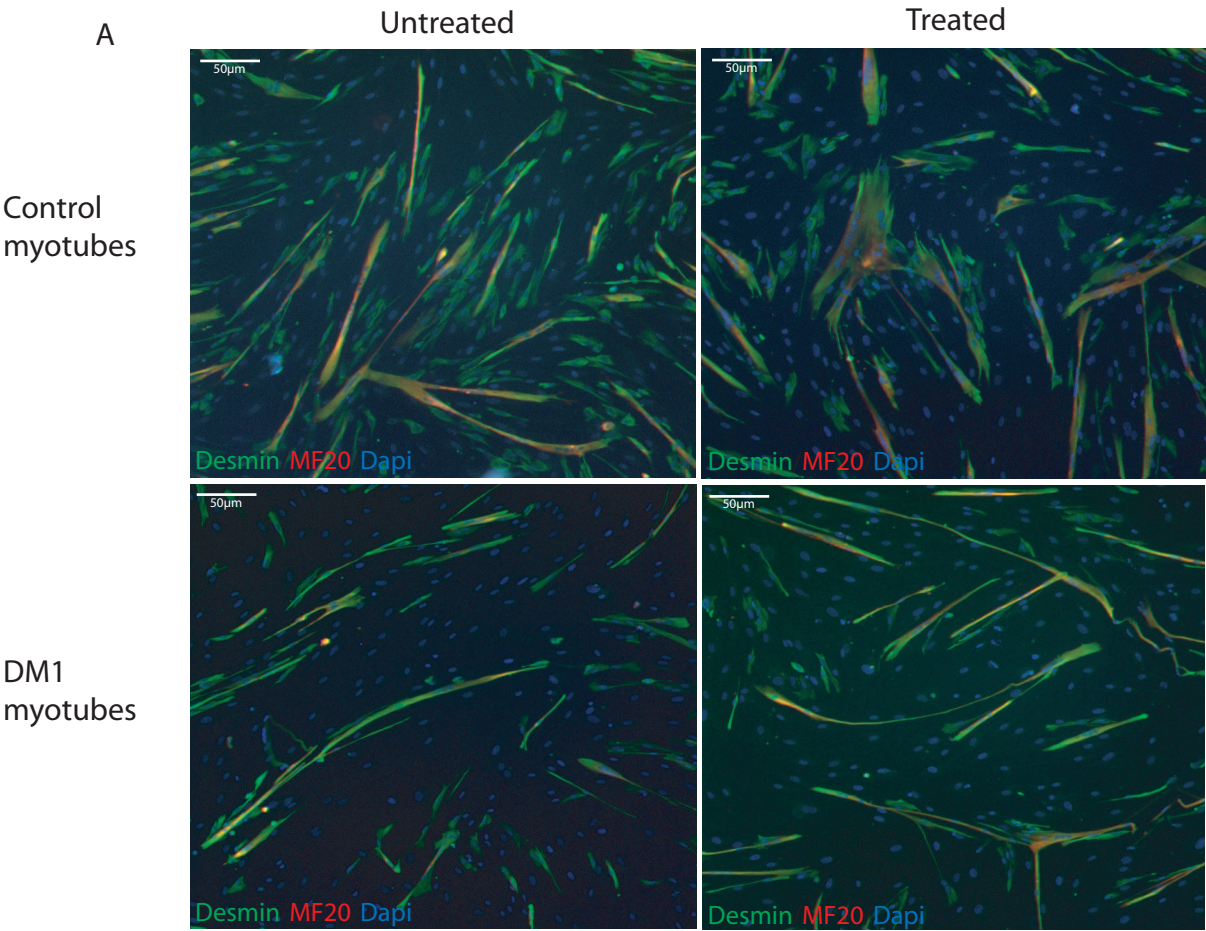
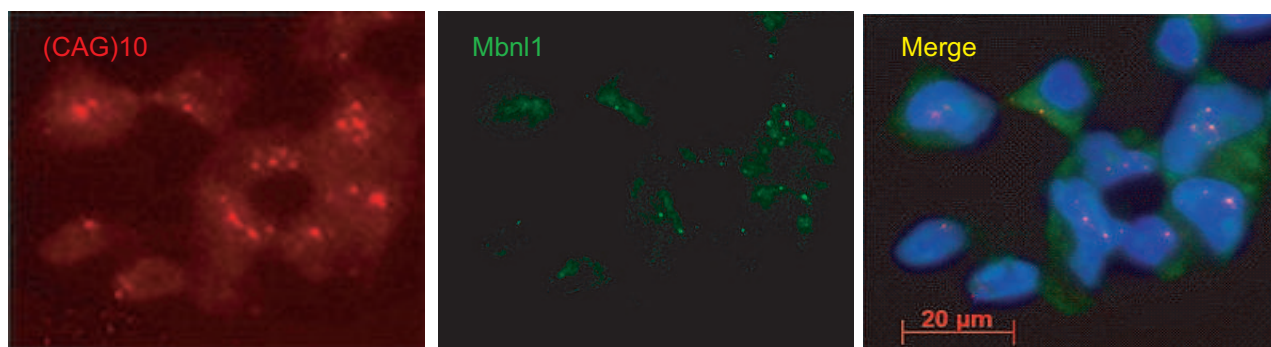
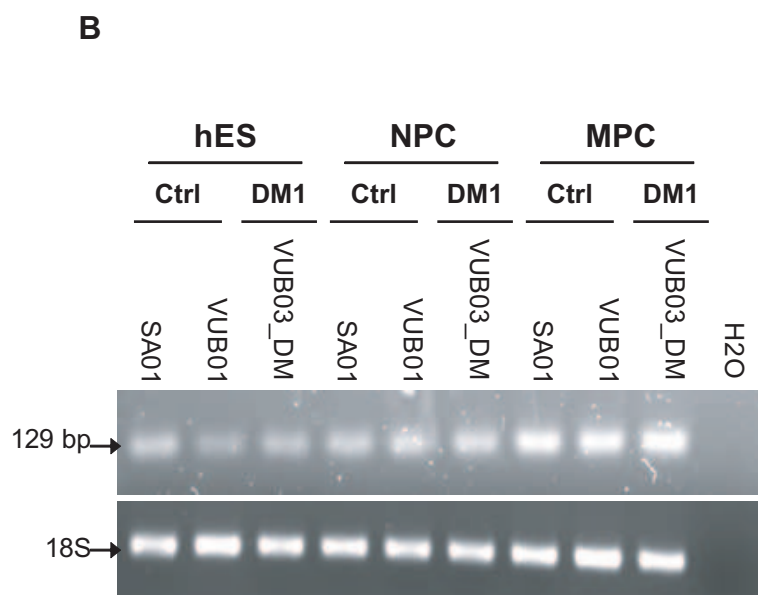
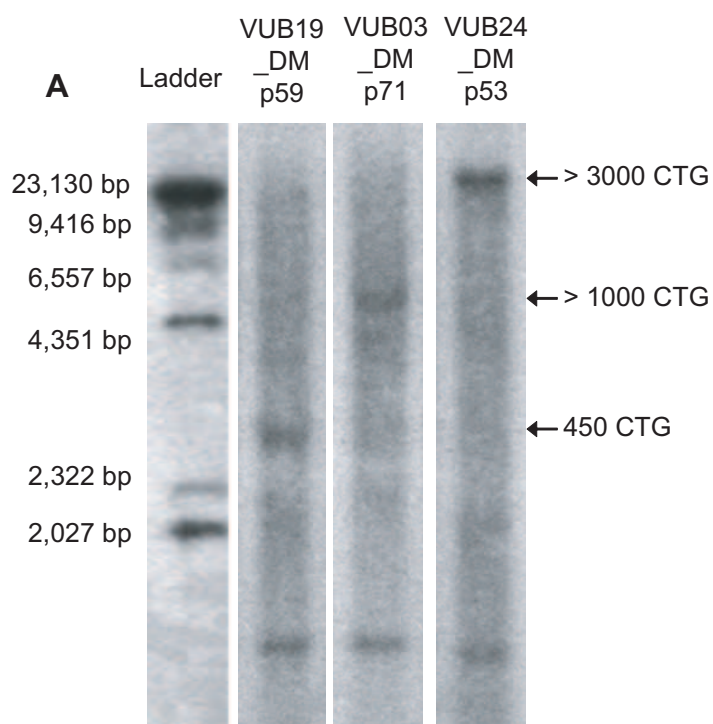
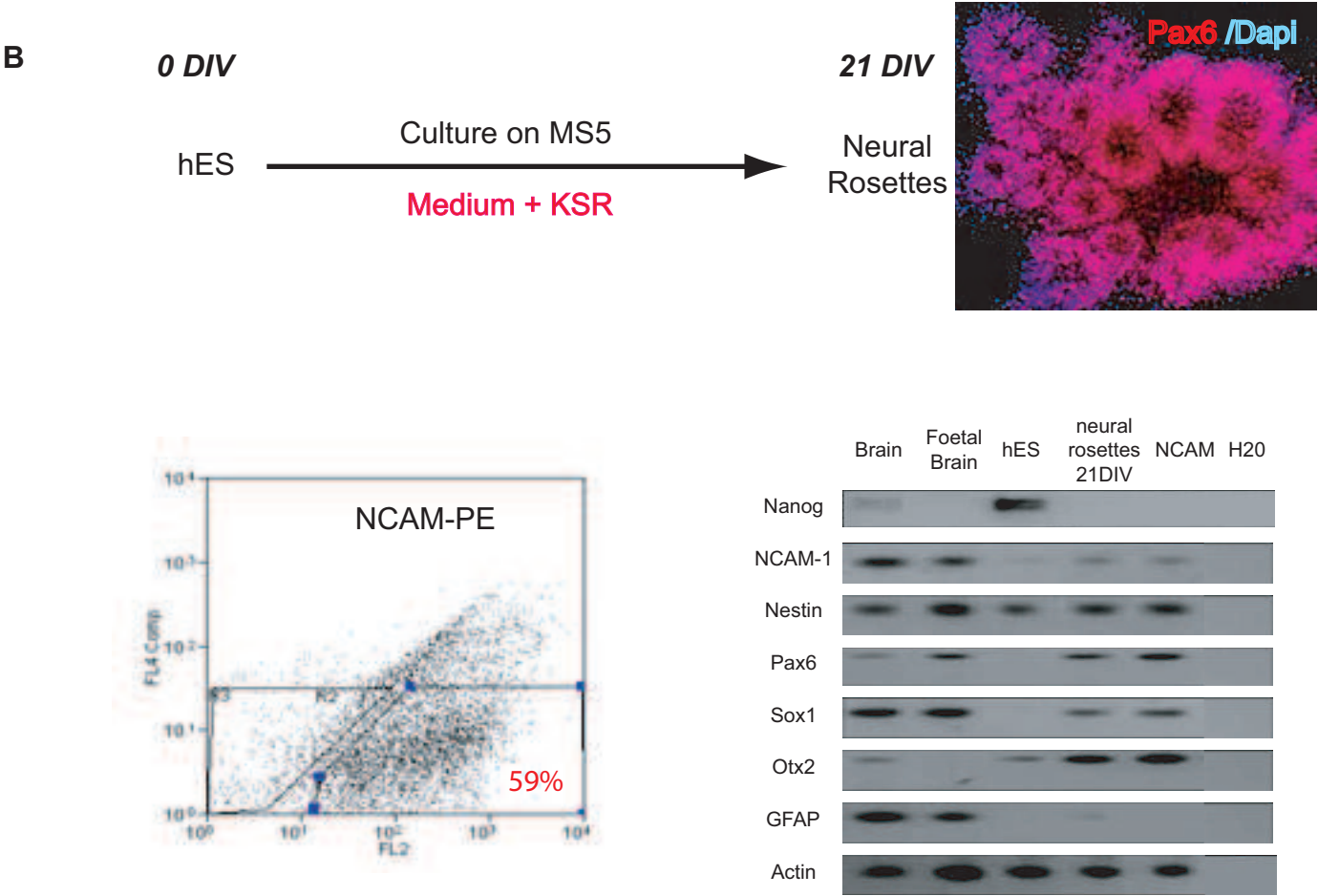
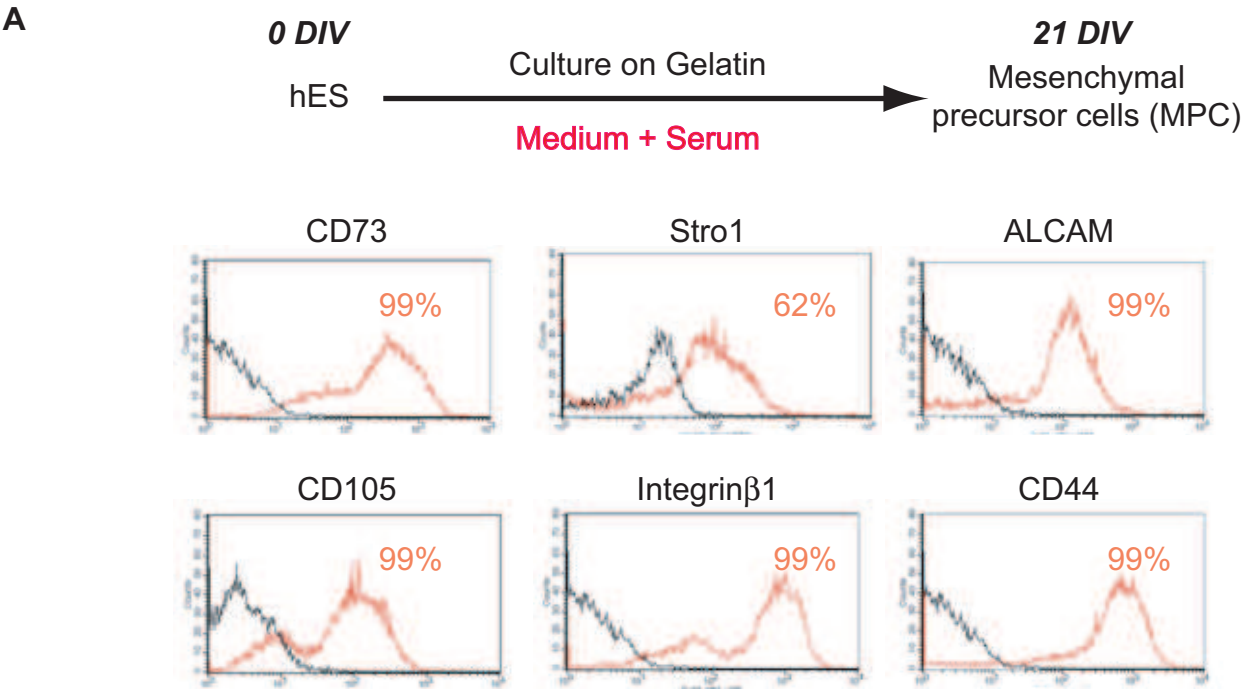


Figure 6 -Marteyn et al.

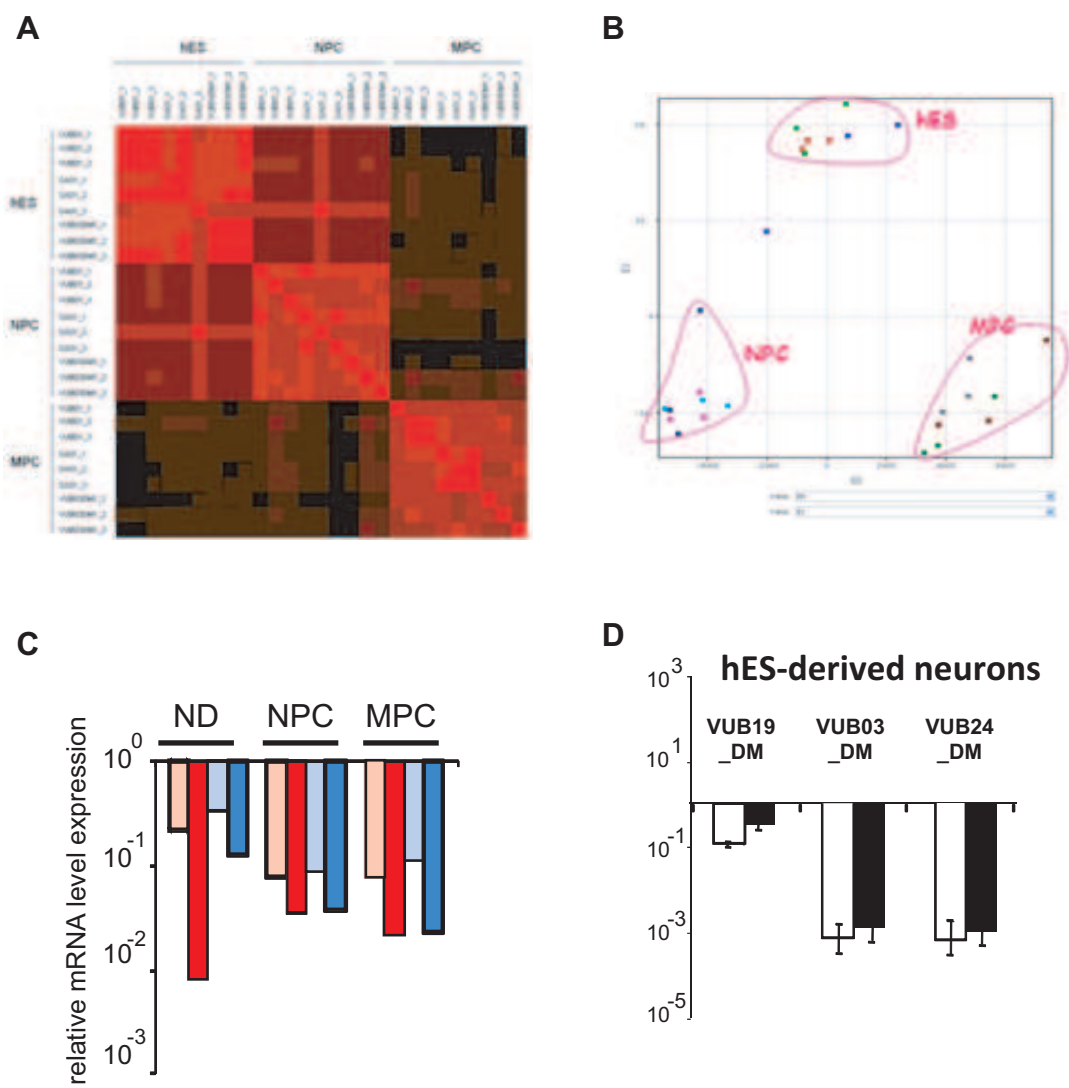


Supplementary Figure 1- Marteyn et al.

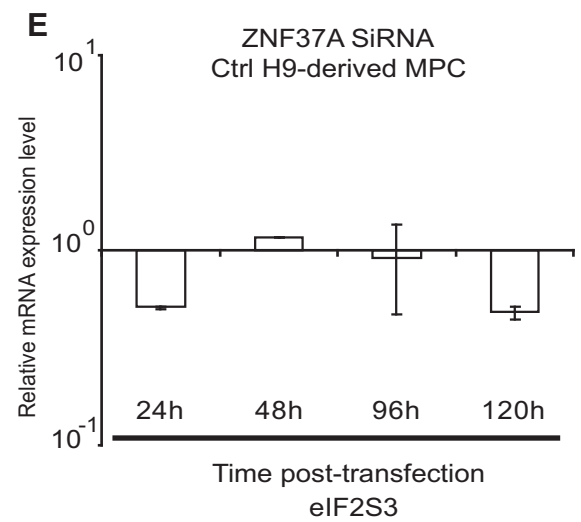
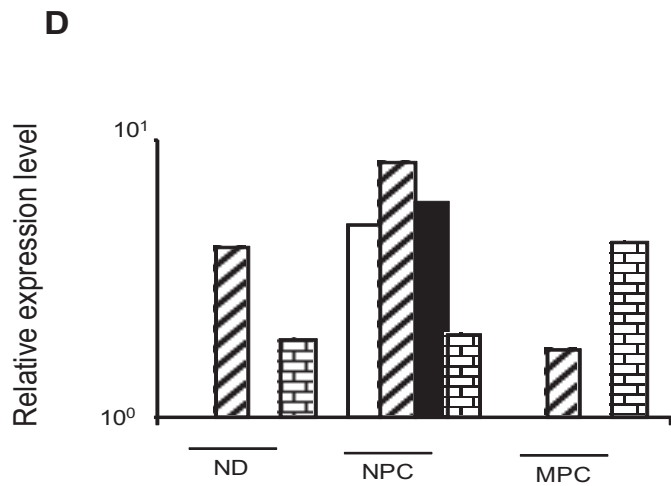
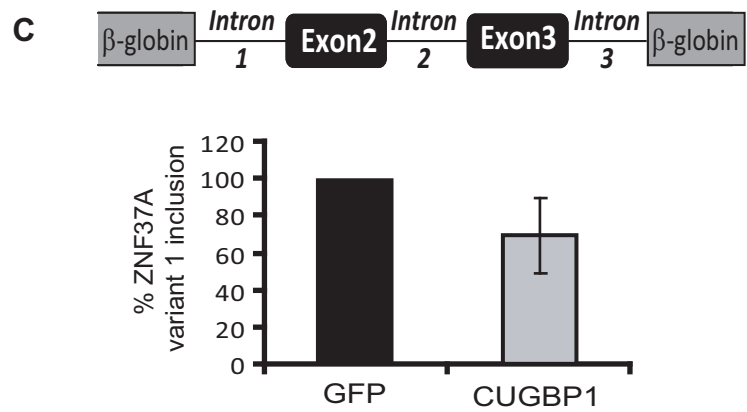
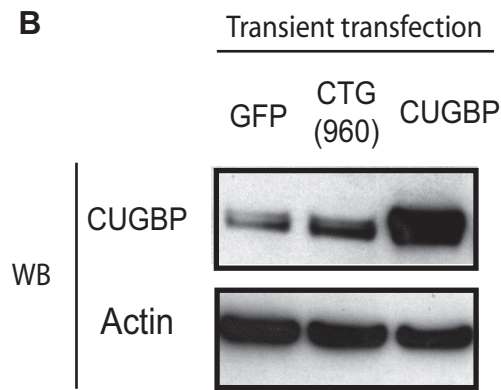
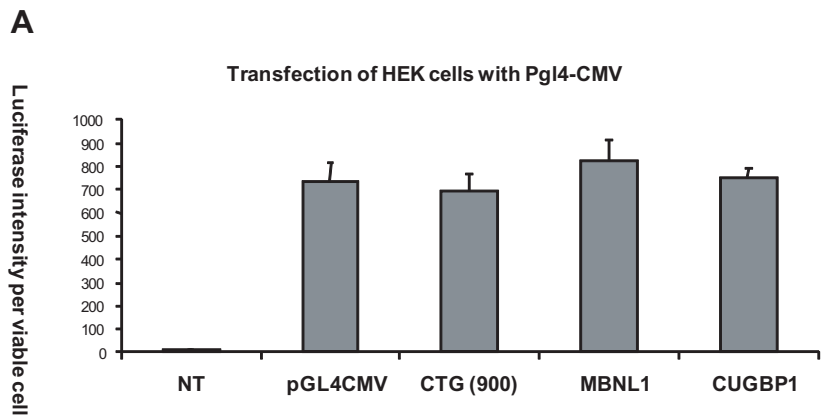




Supplementary Figure 3- Marteyn et al.



Supplementary Figure 4- Marteyn et al.



Supplementary Figure 1: Molecular characterization of the three DM1-mutated hES cells and their progenies. (A) Determination of the CTG repeat size in the three DM1 hES-derived MPC cell lines: VUB19_DM (450 CTG), VUB03_DM (1050 CTG) and VUB24_DM (>2000 CTG). (B) Analysis of DMPK gene expression by semi-quantitative RT-PCR in undifferentiated hES cells, derived-NPC (Neural Precursors Cells) and MPC (Mesenchymal Precursors cells). Control (SA01, VUB01) and mutant (VUB03_DM) cells were analyzed in parallel. (C) In situ hybridization combined with immunostaining directed against Mbnl1 indicate the colocalization between mutant RNA (red) and MBNL1 (green) in mutant hES-derived NPC cells (VUB03_DM). Scale bar = 20 μ m.

Supplementary Figure 2: Schematic description and characterization of the obtention of mesenchymal and neural precursors cells from hES cell lines. (A) hES-derived MPC were obtained after culture on gelatine in presence of medium containing serum for 21 days. FACS analysis for a combination of mesenchymal markers indicates the homogeneity of the MPC population obtained. (B) hES-derived NPC were obtained from neural rosettes obtained after co-culture of undifferentiated hES on stromal cells (MS5) in presence of KSR medium for 21 days. NCAM⁺ cells were isolated from neural rosettes by FACS-sorting, corresponding to 59% of cells and presenting the characteristics of neural precursor cells, as identified by RT-PCR analysis.

Supplementary Figure 3: Identification and validation of ZNF37A down expression in association with DM1. (A) Correlation coefficient between triplicate samples for hES, NPC and MPC derived from VUB03_DM and two controls, VUB01 and SA01, cells. Red gradient represents R^2 ranging from 0.98 to 0.95. (B) Principal Component Analysis (PCA) of the normalized hybridization intensity values on DNA chips for all cell lines and phenotypes, and projected on the first two axis (E0 and E1). Each square indicates the expression values for one DNA Chip, colors represent the biological triplicates for the same cell line. Data were

obtained with Array Assist software (Stratagen). (C) Correlation of ZNF37A down expression between DNA Chip and real-time RT-PCR for hES, NPC and MPC in VUB03_DM compared either with control VUB01 (pink box, DNA Chip; red box, RT-PCR) and with SA01 (blue box, DNA Chip; dark blue box, RT-PCR). Data represent log scale mRNA relative expression level after normalization with the house keeping gene β -tubulin. (D) Quantitative real time RT-PCR analysis for ZNF37A in the three mutant hES-derived neurons. Data (n=3) are presented as values of the control VUB01 cell line (white bars) or H9 cell lines (black bars) after normalization with cyclophilin levels.

Supplementary Figure 4: (A) HEK293 cells were cotransfected with pGL4CMV and plasmids coding for 960 CTG repeats (CTG 960) or RNA-binding protein (CUGBP1, ETR3, MBNL1). Forty-eight hours after transfection luciferase analysis was performed. No significant differences were observed between conditions. (B) Western blot analysis indicates that transient transfection of a plasmid overexpressing CUGBP1 led to the up expression of the protein. (C) RT-PCR of a transient transfection in HEK293 cells with the minigene containing ZNF37A 5'UTR and CUGBP1. No significant differences in the inclusion or exclusion of ZNF37A V1 were observed. (D) Correlation of IL13RA1 up expression between DNA Chip and real-time RT-PCR for hES, NPC and MPC in DM1 VUB03_DM cell line compared either with controls VUB01 (Plain white box, DNA Chip; Hatched box, RT-PCR) or SA01 (Plain black box, DNA Chip; Brick wall box, RT-PCR). Data represent log scale mRNA relative expression level after normalization with the house keeping gene β -tubulin. (E) No effect of ZNF37A specific siRNA on eIF2S3 expression. Results were obtained at different times after transfection on control H9 hES-derived MPC and analysed by real-time RT-PCR. Data are presented as values of control SiRNA after normalization with Cyclophilin.

Discussion et perspectives

Les différentes études réalisées au cours de mon doctorat s'inscrivent dans le cadre des recherches scientifiques visant à démontrer l'intérêt des CSEh dans la compréhension des mécanismes pathologiques et le traitement de maladies monogéniques humaines. En se basant sur une approche transcriptomique à large échelle, mes travaux se sont focalisés sur la caractérisation de quatre modulations d'expression génique à la fois au niveau moléculaire mais également physiopathologique pouvant contribuer aux défauts myogéniques, dans le cas de *ZNF37A*, et aux conséquences neurophysiopathologiques de la DM1, dans le cas des gènes *SLITRK* et *EphA5*. L'ensemble de ces résultats apportent déjà de nouveaux éléments concernant la physiopathologie de la DM1 mais ils ouvrent également sur des interrogations qui apporteront encore plus de valeurs dans le futur.

1. Quelles sont les conséquences neurophysiopathologiques de la DM1 ?

Dans la mesure où la majorité des études physiopathologiques de la DM1 se sont principalement focalisées sur les affections du système musculaire, peu de choses sont connues quant aux conséquences exactes de la mutation DM1 au niveau du système nerveux. Au niveau symptomatologique, différents phénomènes comme des troubles psychologiques (Delaporte, 1998; Meola, 2003), le développement d'un retard mental (Turnpenny, 1994), ou une tendance à l'hypersomnolence (Damian, 2001; Park, 1995) ont pu être observés chez des patients porteurs de la mutation DM1. Au niveau tissulaire, plusieurs études ont révélé diverses anomalies pouvant affecter les synapses telles qu'une démyélinisation axonale (von Giesen, 1994), ou une croissance neuritique exagérée des motoneurons spinaux (Nagao, 2003). Cependant, les bases cellulaires et moléculaires de ces anomalies restent mal comprises. Jiang *et al.* ont été les premiers à observer au niveau de biopsies cérébrales post-mortem de patients DM1 des *foci* présents majoritairement dans les neurones corticaux (Jiang, 2004). En utilisant une approche « gène candidat », les auteurs ont également recherché la présence de défauts d'épissages alternatifs. Ils ont ainsi identifié des anomalies d'isoformes affectant l'expression de la sous-unité 1 du récepteur au glutamate (NMDAR1) et de la protéine associée aux microtubules Tau.

Dans le SNC, les récepteurs au glutamate jouent un rôle clef dans l'excitation de la neurotransmission. Les récepteurs au NMDA, sous-ensemble de cette famille de récepteurs, sont fortement impliqués dans le développement du SNC ainsi que dans la plasticité et la transmission synaptique, connus pour leurs rôles importants dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. De plus, la fixation du glutamate sur leurs récepteurs peut également mener à la dégradation des cellules en provoquant un fort influx intracellulaire d'ion calcium Ca^{2+} , responsable de l'activation de certains enzymes comme les phospholipases C. Ce processus pathologique d'excitotoxicité est

incriminé dans de nombreuses maladies neurologiques telles que l'épilepsie et les accidents vasculaires cérébraux, ainsi que dans des maladies neurodégénératives du SNC comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la chorée de Huntington (Greenamyre, 1994).

L'équipe de Jiang a identifié une augmentation d'un facteur trois de cette inclusion dans des biopsies de cerveaux post-mortem DM1. Cette augmentation serait contrôlée par la protéine CUGBP2 ou ETR3 (Zhang, 2002). De façon intéressante, des études ont suggéré que l'inclusion de l'exon 5 de *NMDAR1* pouvait sérieusement affecter les fonctions du récepteur NMDAR1 puisque l'insertion de cet exon est associée à une forte diminution d'affinité pour le NMDA, à une baisse de l'activité des polyamines, à une augmentation de l'action de la PKC (Durand, 1993) ou encore à une insensibilité aux protons dans l'environnement extracellulaire (Traynelis, 1995). Ainsi, comme les récepteurs NMDAR1 contenant l'exon 5 se désensibilisent plus lentement, il est possible qu'ils contribuent à la vulnérabilité neuronale par excitotoxicité. De plus, le compartiment cellulaire d'expression des ARNm de *NMDAR1* dans les neurones de l'hippocampe est différent selon l'insertion ou non de cet exon. En effet, il a été montré que les protéines de *NMDAR1* contenant l'exon 5 sont uniquement exprimées dans le soma des cellules puisque leur 5'UTR ne possède pas la séquence de 24 nucléotides responsable de leur transport dans les neurites des neurones (Pal, 2003). Bien que non formellement démontré, l'augmentation de l'expression de l'isoforme contenant l'exon 5 de *NMDAR1* pourrait en partie expliquer les troubles de la mémoire observés chez des patients DM1 (Jiang, 2004).

Dans le cas du gène codant pour la protéine TAU, des anomalies d'inclusion ou d'exclusion des exons 2, 3 et 10 ont été montrées (Dhaenens *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2004). La protéine TAU appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (Cleveland *et al.*, 1977). Elle est principalement localisée au niveau des axones des neurones où elle contrôle essentiellement la polymérisation des microtubules, filaments du cytosquelette transportant les matériaux synthétisés du corps cellulaire vers les terminaisons nerveuses. Une hyperphosphorylation anormale de cette protéine aboutit à la formation de trois variants pathologiques qui vont s'agréger sous forme de filaments pathologiques et provoquer une dégénérescence neurofibrillaire par dépolymérisation des microtubules dans les cellules nerveuses. Ces accumulations de fibrilles pathologiques (Sergeant *et al.*, 2005) sont responsables de nombreux désordres neurodégénératifs comme des démences, regroupés sous le nom de tauopathies (Williams, 2006). Une telle accumulation est également observée dans les aires mésolimbiques des cerveaux de patients DM1 (Mitake *et al.*, 1989; Sergeant *et al.*, 2001) et pourrait être due à l'expression inappropriée des isoformes de cette protéine. Les conséquences physiopathologiques de ces observations restent hypothétiques et pourraient être reliées à l'apparition progressive des troubles cognitifs et de mémorisation, ainsi que de la démence des patients DM1.

Ces deux exemples illustrent bien à la fois la difficulté à établir la relation spécifique de cause à effet mais également le peu de données existants quant aux conséquences physiopathologiques de la mutation DM1 au niveau du système nerveux. Ce dernier point est encore plus prononcé en ce qui concerne les conséquences fonctionnelles de la mutation DM1 au niveau des motoneurones, qui constituent pourtant un des acteurs majeurs dans le syndrome myotonique associé à la DM1. Jusqu'à présent, les différents défauts affectant les motoneurones, observés chez des patients DM1 ou dans des modèles animaux DM1 tels que le modèle murin transgénique exprimant environ 300 répétitions CTG, ont permis de révéler des *foci* au niveau des motoneurones spinaux de patients DM1 (Wheeler *et al.*, 2007a), une hyperprolifération synaptique au niveau des jonctions neuromusculaires (Nagao *et al.*, 2003), une tendance à la démyélinisation des fibres nerveuses (Panaite *et al.*, 2008) ou encore la structure anormale des terminaisons nerveuses motrice (Panaite *et al.*, 2008; Stranock and Davis, 1978).

En nous basant sur le potentiel pluripotent offert par les CSEh, et en particulier leur différenciation dans la voie cholinergique, nous avons ainsi pu valider les anomalies d'expression génique détectées au niveau de précurseurs neuraux issus des CSEh porteuses de la mutation DM1 au niveau d'un système cellulaire plus pertinent dans son analyse physiopathologique. Ainsi, par l'élaboration de ce modèle, nous avons pu identifier plusieurs modulations d'expression génique tout au long de la différenciation cholinergique des CSEh en motoneurones.

En particulier, en utilisant également une approche « gènes candidats », un défaut d'épissage du transcrit codant pour le récepteur EphA5 a pu être mis en évidence. Cette anomalie entraîne une augmentation de l'isoforme contenant l'exon 9. Bien que le rôle important joué par le récepteur à activité tyrosine kinase Ephrin A5 dans la croissance neuritique ainsi que dans la plasticité synaptique soit relativement bien décrit, peu de choses sont connues quant à la fonction cellulaire des 2 isoformes correspondant à ce récepteur (Eberhart *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2000; Miescher *et al.*, 1997). L'inclusion de l'expression de l'exon 9 semble aboutir à l'expression d'une séquence supplémentaire juxtaposant le domaine transmembranaire dans le domaine C-terminal de la protéine. Une analyse prédictive de la structure de ces isoformes suggère que l'inclusion de cette séquence n'aboutit à aucune modification au niveau du domaine extracellulaire permettant la fixation du ligand mais également au niveau des sites catalytiques de phosphorylation dans le domaine C-terminal (Analyse réalisée par UniProtKB/Swiss-Prot). Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'une différence, en terme de localisation et / ou d'activité, n'existe pas entre ces deux isoformes, hypothèse sur laquelle nous travaillons actuellement en regardant notamment si les voies de signalisation activées par ce récepteur ne sont pas modifiées entre les cellules mutées et contrôles. Pour cela, une étude se basant sur la quantification de l'état de phosphorylation de différentes molécules impliquées dans les voies de

signalisation contrôlées par EphA5, telles que les kinases Src (Kao *et al.*, 2009; Murai et Pasquale, 2004, les MAPK, Rac1/cdc42, (Shamah *et al.*, 2001). De même, la possibilité que ces deux isoformes puissent interagir avec l'ephexine sera étudiée par co-immunoprécipitation, dans la mesure où l'ephexine a été montrée pour interagir directement avec EphA après fixation du ligand ephA sur le récepteur EphA. L'ephexine correspondrait à un des premiers acteurs de la voie de signalisation des EphA (Shamah *et al.*, 2001). Cependant, une telle analyse ne nous permettra pas de comprendre les conséquences physiopathologiques exactes de cette observation et en particulier son implication dans la neuritogenèse et la synaptogenèse, comme nous le supposons. La surexpression de l'isoforme contenant l'exon 9 au niveau de cultures cholinergiques issues de CSEh contrôles, suivie par une analyse du réseau neuritique et de la capacité de ces neurones à interagir avec leur cible musculaire devrait nous permettre de répondre à ces questions.

Contrairement à l'EphA5, l'altération de l'expression de SLITRK4 et SLITRK2 qui a été confirmée tout au long de la différenciation cholinergique des CSEh en motoneurones, a pu être reliée à des défauts fonctionnels affectant la neuritogenèse et la mise en place des contacts synaptiques avec des cibles musculaires à des stades précoces du développement.

Les molécules appartenant à la famille SLITRK n'ont été identifiées récemment chez la souris et l'Homme en étudiant les gènes dérégulés dans des modèles de souris présentant des défauts du tube neural (Aruga et Mikoshiba, 2003; Aruga *et al.*, 2003). Peu de choses sont encore connues quant à leur fonction exacte et à leur mécanisme d'action.

Dans la mesure où ces molécules possèdent des régions riches en leucine au niveau de leur domaine extracellulaire, elles présentent une forte homologie aux protéines sécrétées SLIT, connues pour leur rôle dans la guidance neuritique (Brose *et al.*, 1999). Cependant, contrairement aux molécules SLIT qui se fixent sur le récepteur ROBO, aucune interaction avec ce type de récepteur n'a été démontrée dans le cas des protéines SLITRK. Leur domaine intracellulaire présente quant à lui de fortes homologies de séquence avec les domaines intracellulaires des récepteurs aux neurotrophines Trk suggérant l'implication des domaines intracellulaires de SLITRK dans une transduction signalitique médiée par des tyrosines kinases. En particulier, la similarité entre les domaines C-terminaux des SLITRK et des récepteurs Trk suggère que les SLITRK pourraient prendre part aux voies de signalisation des phospholipases C (PLC) et par conséquent dans les voies contrôlant l'assemblage du cytosquelette d'actine (Wang et Bitar, 1998). Cependant, ceci reste hypothétique dans la mesure où aucune donnée n'a à ce jour confirmé ou infirmé ces conclusions au niveau fonctionnel.

Corroborant toutefois avec une possible fonction des protéines SLITRK dans la neuritogénèse, ces molécules sont principalement détectées au niveau du système nerveux (Aruga et Mikoshiba, 2003;

Aruga *et al.*, 2003). De façon intéressante, Slitrk2 est exprimée au niveau de la moelle épinière de la souris et ceci à des temps très précoces du développement (E9.5). De part son profil d'expression durant le développement de la moelle épinière, il semblerait que Slitrk2 soit plus fortement exprimé dans les cellules neuronales immatures et que son expression diminue au cours du processus de maturation (Aruga et Mikoshiba, 2003). Confirmant l'implication de cette protéine dans la neuritogénèse, sa surexpression au niveau des cellules murines PC12 est responsable d'une forte inhibition de la formation du réseau neuritique. Des résultats similaires sont également observés avec Slitrk4, bien que cette dernière semble plutôt agir sur le nombre de neurites par cellule (Aruga et Mikoshiba, 2003)

Les mécanismes moléculaires et cellulaires permettant de comprendre le rôle de ces molécules dans la neuritogénèse restent hypothétiques. Comme mentionné préalablement, ces molécules pourraient intervenir dans la régulation du cytosquelette d'actine. En vue de leur profil d'expression et de leur rôle *in vitro* dans la neuritogénèse, il a été postulé que les slitrk pourraient agir de façon coopérative dans le contrôle du développement neuritique (Aruga et Mikoshiba, 2003).

Bien que n'apportant pas d'éléments nouveaux quant à leur mécanisme d'action, nos résultats confirment dans un système humain le rôle de ces molécules dans la régulation neuritique et permet d'étendre leur implication au niveau de la formation et du maintien de la jonction neuromusculaire. Concernant ce dernier point, il serait intéressant, à cours terme, d'étudier de façon plus approfondie l'implication de SLITRK2 et SLITRK4 dans la formation ou le maintien de cette structure intercellulaire en regardant tout d'abord si leur surexpression au niveau des cellules cholinergiques issues des CSEh DM1 aboutit à une restauration des défauts observés au niveau des zones de contact avec les cellules musculaires. Par ailleurs, différents paramètres de la jonction neuromusculaire pourraient également être étudiés. Il serait particulièrement intéressant de vérifier si un traitement par de l'agrine pourrait compenser les défauts observés dans le cas des cellules mutées (Simeone *et al.*, 2010). Afin d'être en mesure d'analyser de façon plus spécifique les zones de contact observées entre les motoneurones issus des CSEh et les cellules musculaires, nous collaborons avec la société NeuronExpert qui a déjà développé cette approche expérimentale.

Par ailleurs, dans la mesure où le défaut d'expression des gènes SLITRK2 et SLITRK4 est détecté au stade de précurseurs neuraux DM1, il est envisagé de vérifier si cette absence d'expression est spécifique des motoneurones ou si elle s'étend à d'autres types de neurones, tels que des populations corticales (Gaspard *et al.*, 2009), permettant de confirmer les observations de Jiang *et al.* chez des biopsies de cerveau post-mortem de patients DM1 (Jiang *et al.*, 2004).

L'une des principales difficultés rencontrée au cours de cette étude a été de valider notre hypothèse de travail en associant les défauts d'expression génique des gènes SLITRK2 et SLITRK4 à l'augmentation de l'arborisation neuritique et à la diminution du nombre de jonction neuromusculaire. Bien que nous ayons eu l'opportunité d'avoir accès à quelques échantillons de biopsies de cerveaux de patients DM1, nous n'avons pas eu l'occasion de valider nos résultats sur des échantillons plus adaptés à notre étude comme des échantillons de moelle épinière humaine. Une étude préliminaire, réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Gourdon qui a développé des souris transgéniques DM1 exprimant plus de 1000 répétitions CTG (Gomes-Pereira *et al.*, 2007), ne nous a pas permis de valider nos résultats au niveau de la moelle épinière de ces souris. Ce résultat négatif pourrait être dû à l'âge trop avancé des souris (3 mois). Dans la mesure où nous ne pouvons pas exclure la mise en place par l'organisme de mécanismes de compensation qui permettraient de prévenir pendant plusieurs années les conséquences pathologiques de ces défauts d'expression génique, il serait intéressant de réaliser de nouveau cette étude sur des embryons de souris pris à différents temps durant le développement. De tels phénomènes de compensation pourraient également expliquer pourquoi, alors que notre étude *in vitro* révèle des anomalies importantes de neuritogénèse et de synaptogenèse, de tels phénotypes ne soient pas observés chez les patients DM1, même si nous ne pouvons pas exclure que le système cellulaire utilisé ainsi que les conditions de culture ne soient pas à l'origine de ce phénotype exacerbé.

Parallèlement aux conséquences physiopathologiques de ces anomalies d'expression, les mécanismes moléculaires par lesquels la présence de répétitions CTG aboutit à ces anomalies d'expression génique tendent à être mieux comprises. Dans le cas de l'anomalie d'expression de l'EphA5, et bien qu'une étude plus poussée soit nécessaire pour affiner les mécanismes, l'utilisation d'un minigène nous a permis de déterminer que ce défaut dépendait de la protéine MBNL1 et de son rôle dans le processus d'épissage. En revanche, une étude préliminaire semble indiquer que l'expression de SLITRK2 et SLITRK4 ne dépend pas de MBNL1, puisque l'extinction de cette dernière n'engendre aucune modulation des SLITRK. Ces résultats viennent appuyer les conclusions récentes d'autres études qui expliquent certains défauts de la DM1 par l'implication de mécanismes différents de celui des défauts d'épissage alternatif des pré-ARNm (Osborne *et al.*, 2009). Ce point sera discuté plus particulièrement dans la partie suivante.

L'ensemble de ces résultats ont donc permis d'identifier de nouveaux défauts d'expression génique dont les conséquences fonctionnelles pourraient être impliquées dans les anomalies neurophysiopathologiques associées à la DM1. Malgré des analyses encore modestes, les travaux menés sur les conséquences neuropathologiques de la DM1, nous permettent d'envisager que ces mécanismes représentent un fort potentiel qui se doit d'être approfondi.

2. La DM1 : maladie des épissages alternatifs altérés ou maladie à plus large spectre ?

Comme cela a été abordé précédemment, la majorité des études mécanistiques liées à l'expression de répétitions CTG s'est focalisé sur l'identification de défauts d'épissage alternatif. En particulier, la démonstration de l'expression altérée de certaines protéines de régulation de l'épissage telles que MBNL1 et CUGBP1 à cause de la présence des répétitions CTG, a poussé le chemin exploratoire des mécanismes physiopathologiques de la DM1 vers l'identification d'un certain nombre de gènes présentant des défauts d'épissage, qui de part leur fonction cellulaire pouvaient être reliés à des symptômes cliniques de la pathologie.

L'analyse transcriptomique réalisée sur les CSEh DM1 et leurs progénies, bien que pouvant apparaître comme une approche inappropriée pour cette maladie considérée comme restreinte à des anomalies d'épissage alternatif, s'est révélée au contraire très informative. En effet, outre les gènes *SLITRK* mentionnés précédemment, cette analyse a permis d'identifier un autre gène, *ZNF37A*, dont l'expression semble être modulée par la présence des répétitions CTG et par un mécanisme différent de celui impliquant un défaut d'épissage alternatif. Ainsi nos résultats indiquent que la protéine CUGBP1 pourrait intervenir dans la régulation de l'expression de *ZNF37A* en jouant sur la stabilité de ses transcrits.

De façon intéressante, ces résultats concordent avec quelques études qui indiquent que les modulations du niveau d'expression de CUGBP1 observées dans la DM1 affecteraient également ses fonctions cytoplasmiques impliqués dans la traduction et la stabilité de certains ARNm, en plus de son rôle dans la régulation de l'épissage alternatif. Ainsi CUGBP1 contrôlerait l'efficacité de traduction de l'ARNm codant pour p21 en se fixant à sa région 5'UTR. Consécutivement, une diminution de la traduction de p21 due à une baisse cytoplasmique de CUGBP1 a été associée à un défaut de la différenciation myogénique dans la DM1 (Timchenko *et al.*, 2001). Plus récemment, différentes études ont montré que les modulations du niveau d'expression de CUGBP1 dans la DM1 pouvaient aboutir à des anomalies de stabilité des ARNm codant pour le TNF, entraînant ainsi une augmentation de l'expression de ce facteur. De part ses fonctions cellulaires, les auteurs de ces études postulent que cette modulation d'expression du TNF pourrait participer à différents phénotypes de la DM1 tels que la dégénérescence musculaire ou l'insulino-résistance, bien que cette contribution pathologique ne soit pas clairement démontrée (Zhang *et al.*, 2008). Par le biais de sa fonction de déadénylation, CUG-BP1 modifierait la stabilité des ARNm de TNF. Démonstré dans un premier temps chez le Xénope puis vérifié par la suite chez l'Homme (Paillard *et al.*, 2003), il a été montré que CUGBP1 affecterait la longueur de la queue poly(A) des transcrits auxquels il se fixe au niveau des séquences ARE (Element

Rich en GU), ce qui entraînerait leur dégradation (Moraes *et al.*, 2006; Vlasova et Bohjanen, 2008; Vlasova *et al.*, 2008).

A plus large échelle, l'ensemble de ces données rejoint les récentes études qui suggèrent que les mécanismes par lesquels les répétitions CTG affectent la cellule pourraient être plus étendus. En effet, en utilisant les souris transgéniques HSA^{LR}, qui présentent près de 250 répétitions CTG dans la région 3'UTR de l'alpha-actine du muscle squelettique (Mankodi *et al.*, 2000), les travaux d'Osborne *et al.* suggèrent que les répétitions CUG de l'ARN mutant sont capables d'influer directement sur l'expression de certains gènes en interférant au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Osborne *et al.*, 2009). De même, il a été suggéré que la transcription de plusieurs gènes, comme NKX2.5 au niveau du tissu cardiaque, pourrait être affectée par la séquestration de facteurs de transcription, comme SP1 (Specificity protein 1) au niveau des expansions de triplets CUG des transcrits DMPK mutants bien que cette hypothèse n'ait pas été clairement démontrée (Ebraldize *et al.*, 2004; Yadava *et al.*, 2008).

En association avec ces précédents travaux, nos résultats confortent l'idée que les mécanismes moléculaires associés à l'expression de triplets CTG ne se limitent pas à des anomalies des défauts d'épissage mais auraient des conséquences moléculaires beaucoup plus complexes.

3. Quelle est la meilleure approche permettant d'étudier les mécanismes physiopathologiques d'une maladie?

L'une des principales difficultés rencontrée au cours de l'étude concernant la modulation de l'expression de ZNF37A a été de relier ce défaut d'expression génique à un phénotype dans la mesure où quand nous avons initié cette étude aucune fonction particulière n'avait été associée à ce gène. De part sa forte homologie de séquence avec les répresseurs de la transcription à domaine Krab et son interaction avec la protéine Kap1 connue pour participer aux mécanismes répresseurs de ces facteurs (Urrutia, 2003), nous avons postulé que la diminution d'expression de ZNF37A pouvait être impliquée dans l'augmentation d'expression de sa ou ses cibles moléculaires. En nous basant sur la liste des gènes identifiés par l'approche transcriptomique, nous avons identifié trois candidats possibles pour ZNF37A : le gène codant pour la sous-unité alpha1 du récepteur à l'IL13 (IL13RA1), la cathepsin B et eIF2a4. La technique d'immunoprécipitation de la chromatine nous a permis d'identifier une région du promoteur du gène IL13RA1 sur lequel ZNF37A se fixe. De plus, l'extinction de l'expression de ZNF37A par une approche de siRNA aboutit à une augmentation de l'expression de l'IL13RA1. Cependant l'absence de corrélation linéaire entre l'extinction de ZNF37A et la surexpression de l'IL13RA1 suggère que ZNF37A tenderait plus à participer qu'à contrôler la régulation négative de

l'expression du gène *IL13RA1*. Malencontreusement, la surexpression de *ZNF37A* n'a que peu d'effet sur l'expression de *IL13RA1*, probablement dû au fait que cette surexpression entraîne un effet répresseur de *ZNF37A* sur lui-même.

L'*IL13RA1* est un constituant du récepteur commun aux cytokines *IL4* et *IL13*, qui ont été décrites pour intervenir dans le processus de maturation myogénique en favorisant la fusion de nouveaux myoblastes à des myotubes en formation (Horsley *et al.*, 2003; Jacquemin *et al.*, 2007). De façon intéressante, un traitement à l'*IL13/IL4* n'a aucun effet positif sur la différenciation des myoblastes issus de patients DM1, contrairement à ce qui est observé sur des myoblastes contrôles. Des expériences préliminaires suggèrent que cette différence de réponse pourrait être reliée à un défaut dans l'activation de la voie de signalisation en amont de l'*IL13RA1*. Cette hypothèse est actuellement explorée au laboratoire. De même, une étude quantitative de l'*IL13RA1* ainsi que son état de phosphorylation est en cours afin de corrèler l'augmentation d'expression de l'ARNm au niveau protéique. Mais le point qui nous semble le plus important est d'essayer de voir si des modulations d'expression de *ZNF37A* au niveau des myoblastes peuvent modifier leur capacité à se différencier. Pour cela, des expériences d'extinction de *ZNF37A* dans des myoblastes contrôles sont actuellement en cours.

Même si des expériences complémentaires sont nécessaires, l'ensemble de ces résultats semble cependant indiquer l'existence potentielle d'un nouveau mécanisme pouvant être impliqué dans les anomalies de différenciation et/ou de régénération myogénique observées dans la DM1. De façon intéressante, ces mécanismes semblent impliquer la protéine CUGBP1 pour laquelle un rôle dans la différenciation myogénique a déjà été observé. En effet, CUGBP1 contrôlerait l'efficacité de traduction de l'ARNm codant pour l'inhibiteur du cycle cellulaire p21. Ainsi une diminution de la traduction de p21, résultant d'une baisse cytoplasmique de CUGBP1, a été associée à un défaut de différenciation myogénique à cause de l'empêchement des cellules à sortir du cycle cellulaire (Timchenko *et al.*, 2001). Ceci illustre la complexité des mécanismes impliqués dans la DM1. Par ailleurs, l'implication dans cette pathologie de protéines de liaison à l'ARN qui présentent des fonctions multiples, ainsi que les multiples sites d'action des répétitions CTG peuvent expliquer le phénomène pléiotrope de la DM1.

Comme illustré avec *ZNF37A*, l'identification de la fonction d'un gène est fréquemment l'obstacle qui restreint la portée des résultats fournis par ce type d'étude. Cette difficulté soulève également le point de la méthodologie et du recul à adopter avant d'entreprendre de développer de nouveaux modèles pour étudier une pathologie (Colman et Dreesen, 2009). En particulier, la possibilité de pouvoir valider les observations dans différents systèmes d'étude constitue un point crucial. Pour cela, il est donc important de pouvoir avoir idéalement accès à des biopsies de patients,

ou à d'autres modèles. La présence d'un consortium pour une pathologie, comme c'est le cas pour la DM1, procure un avantage non négligeable.

Notre étude sur ZNF37A illustre également les différentes difficultés rencontrées en utilisant une approche à large échelle plutôt qu'une approche « gène candidat ». Cette dernière a été principalement utilisée dans le cadre de la DM1 en se focalisant sur l'identification d'altérations géniques pouvant être reliées à un signe clinique de la pathologie. A titre d'exemple, c'est par le biais de ce type d'approche que le défaut d'épissage du canal chlore a pu être associé à la myotonie (Wheeler *et al.*, 2007), qu'il a fortement été suggéré que les troubles de conduction cardiaque provenaient d'une mauvaise régulation de l'épissage alternatif de la *cTNT* (Philips *et al.*, 1998), ou encore que l'anomalie d'épissage aboutissant au défaut d'expression d'une isoforme du récepteur à l'insuline puisse être à l'origine de l'insulino-résistance associée à la DM1 (Savkur *et al.*, 2001). Bien que dans la majorité des cas, la démonstration de leur relation de cause à effet n'a pas été clairement étudiée, la relation entre ces anomalies géniques et un potentiel phénotype reste plus facile à développer et à justifier. Cependant, même si l'approche à large échelle peut paraître sur certains points plus difficiles à analyser, elle peut permettre de découvrir des mécanismes encore inconnus. De même, ce type d'approche à la capacité d'identifier de nouveaux biomarqueurs d'une pathologie. Dans le cas de ZNF37A, cette possibilité est en cours d'analyse. A l'aide d'une collaboration avec le Dr. Bassez (Hôpital Henri Mondor, Paris), nous testons actuellement la présence de l'anomalie d'expression de ZNF37A au niveau de lymphocytes périphériques issus de patients DM1 et contrôles afin de tester la possibilité d'utiliser ZNF37A comme biomarqueur.

Outre cette application, ce nouveau marqueur de la pathologie peut également présenter des applications dans le cadre de recherche de composés thérapeutiques. En effet, la construction luciférase contenant une partie de la 5'UTR de ZNF37A semble fortement réagir à l'expression de répétitions CTG. L'utilisation de clones cellulaires stables exprimant cette construction pourrait apparaître utile dans des campagnes de criblages thérapeutiques. En collaboration avec une autre équipe du laboratoire qui s'intéresse au développement de tests et d'outils pour un criblage à l'aide de molécules, cette hypothèse est actuellement testée.

Ainsi, bien qu'elle implique une mécanistique plus complexe, l'utilisation d'une approche à large échelle peut se révéler plus informative que les approches plus classiques de gènes candidats.

4. Les CSEh : nouvel outil cellulaire pour la modélisation pathologique ?

L'enthousiasme de la communauté scientifique pour les CSEh a longtemps concerné leur application en thérapie substitutive. Cependant, depuis environ cinq ans, de plus en plus d'études commencent à démontrer leur utilité dans le cadre d'études physiopathologiques. Le groupe de

Benvenisti a été le premier à illustrer ce concept en utilisant des CSEh issues de DPI dans le cadre du syndrome de l’X fragile (Eiges *et al.*, 2007). Cette étude a permis de révéler l’importance de ce nouveau système cellulaire pour mieux comprendre des mécanismes physiopathologiques intervenants à des stades précoces du développement.

Depuis, quelques études ont permis de valider cette première démonstration. Par exemple, ce système cellulaire présente un intérêt particulier pour l’analyse des mécanismes physiopathologiques de maladies affectant le système nerveux et pour lesquelles peu de modèles cellulaires sont disponibles. Par exemple, l’utilisation des CSEh et leur potentiel de différenciation en motoneurones a permis d’avancer dans la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de l’amyotrophie spinale latérale (Di Giorgio *et al.*, 2007; Karumbayaram *et al.*, 2009; Marchetto *et al.*, 2008).

La démonstration récente de pouvoir reprogrammer une cellule somatique en une cellule pluripotente (iPS) est une grande avancée quant à l’utilisation de cellules pluripotentes humaines dans le cadre de modélisation pathologique, et plus particulièrement pour les pathologies dont l’accès à un DPI n’existe pas. A ce jour, une dizaine de lignées de cellules iPS h porteuses de mutation causale de maladies humaines ont été décrites sans qu’elles soient accompagnées d’une analyse mécanistique (Park *et al.*, 2008). L’étude récente menée par le groupe du Dr. Studer a montré l’intérêt de ce système cellulaire à la fois pour avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement d’une neuropathie rare, telle que la dysautonomie familiale, mais également pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Lee *et al.*, 2009). Bien que ces analyses ouvrent de nouvelles perspectives en terme de modélisation pathologique, les différences épigénétiques existantes entre les CSEh et les hIPS peuvent entraîner des résultats différents comme cela a été montré très récemment dans le cas du syndrome de l’X fragile (Eiges *et al.*, 2007).

En conclusion, l’ensemble de mon travail de doctorat corrobore à démontrer l’intérêt des cellules souches pluripotentes humaines, et en particulier des cellules souches embryonnaires humaines, pour avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de maladies monogéniques humaines.

Références bibliographiques

Articles et Revues

- Abe, T., Sato, M., Kuboki, J., Kano, T., and Tamai, M. (1999). Lens epithelial changes and mutated gene expression in patients with myotonic dystrophy. *Br J Ophthalmol* 83, 452-457.
- Adams, L., and Goldman, D. (1998). Role for calcium from the sarcoplasmic reticulum in coupling muscle activity to nicotinic acetylcholine receptor gene expression in rat. *J Neurobiol* 35, 245-257.
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshire, M. G., and Brook, J. D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 8, 1491-1497.
- Amabile, G., and Meissner, A. (2009). Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med* 15, 59-68.
- Amack, J. D., and Mahadevan, M. S. (2001). The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum Mol Genet* 10, 1879-1887.
- Amack, J. D., and Mahadevan, M. S. (2004). Myogenic defects in myotonic dystrophy. *Dev Biol* 265, 294-301.
- Amack, J. D., Reagan, S. R., and Mahadevan, M. S. (2002). Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD. *J Cell Biol* 159, 419-429.
- Amit, M., and Itskovitz-Eldor, J. (2002). Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 200, 225-232.
- Anant, S., Henderson, J. O., Mukhopadhyay, D., Navaratnam, N., Kennedy, S., Min, J., and Davidson, N. O. (2001). Novel role for RNA-binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing. CUGBP2 modulates C to U editing of apolipoprotein B mRNA by interacting with apobec-1 and ACF, the apobec-1 complementation factor. *J Biol Chem* 276, 47338-47351.
- Andrade, A., de Leon, M. B., Hernandez-Hernandez, O., Cisneros, B., and Felix, R. (2007). Myotonic dystrophy CTG repeat expansion alters Ca²⁺ channel functional expression in PC12 cells. *FEBS Lett* 581, 4430-4438.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., and Baylies, M. K. (1998). The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol* 195, 131-143.
- Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2003). Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 24, 117-129.

- Aruga, J., Yokota, N., and Mikoshiba, K. (2003). Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene* 315, 87-94.
- Ashizawa, T., Dunne, P. W., Ward, P. A., Seltzer, W. K., and Richards, C. S. (1994). Effects of the sex of myotonic dystrophy patients on the unstable triplet repeat in their affected offspring. *Neurology* 44, 120-122.
- Aubin, J., Davy, A., and Soriano, P. (2004). In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev* 18, 1482-1494.
- Baharvand, H., Hashemi, S. M., and Shahsavani, M. (2008). Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. *Differentiation* 76, 465-477.
- Bailey, P., Holowacz, T., and Lassar, A. B. (2001). The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. *Curr Opin Cell Biol* 13, 679-689.
- Baker, D. E., Harrison, N. J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H. D., Shaw, P. J., Heath, P. R., Holden, H., and Andrews, P. W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 25, 207-215.
- Bang, A. G., Papalopulu, N., Goulding, M. D., and Kintner, C. (1999). Expression of Pax-3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm. *Dev Biol* 212, 366-380.
- Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N. Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A. L., Bruses, J., Rubio, M. E., Topf, N., *et al.* (2003). Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 21, 1200-1207.
- Barreau, C., Paillard, L., Mereau, A., and Osborne, H. B. (2006). Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie* 88, 515-525.
- BDWG (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89-95.
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., and Mlodzik, M. (1997). muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124, 4321-4331.
- Benders, A. A., Groenen, P. J., Oerlemans, F. T., Veerkamp, J. H., and Wieringa, B. (1997). Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle cells. *J Clin Invest* 100, 1440-1447.
- Bigot, A., Klein, A. F., Gasnier, E., Jacquemin, V., Ravassard, P., Butler-Browne, G., Mouly, V., and Furling, D. (2009). Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am J Pathol* 174, 1435-1442.
- Blumberg, B., Bolado, J., Jr., Moreno, T. A., Kintner, C., Evans, R. M., and Papalopulu, N. (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* 124, 373-379.
- Botta, A., Vallo, L., Rinaldi, F., Bonifazi, E., Amati, F., Biancolella, M., Gambardella, S., Mancinelli, E., Angelini, C., Meola, G., and Novelli, G. (2007). Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene Expr* 13, 339-351.

- Bouhour, F., Bost, M., and Vial, C. (2007). [Steinert disease]. *Presse Med* 36, 965-971.
- Bowser, R., Cudkowicz, M., and Kaddurah-Daouk, R. (2006). Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn* 6, 387-398.
- Brand-Saberi, B., Wilting, J., Ebensperger, C., and Christ, B. (1996). The formation of somite compartments in the avian embryo. *Int J Dev Biol* 40, 411-420.
- Brimble, S. N., Zeng, X., Weiler, D. A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I. G., Freed, W. J., Robins, A. J., Rao, M. S., and Schulz, T. C. (2004). Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev* 13, 585-597.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-445.
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., and et al. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 69, 385.
- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795-806.
- Brunner, H. G., Bruggenwirth, H. T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B. C., Hoppe, R. L., de Die, C. E., Howeler, C. J., van Oost, B. A., Wieringa, B., and et al. (1993). Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am J Hum Genet* 53, 1016-1023.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G., and Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* 6, 1162-1168.
- Carpenter, E. M., Goddard, J. M., Davis, A. P., Nguyen, T. P., and Capecchi, M. R. (1997). Targeted disruption of Hoxd-10 affects mouse hindlimb development. *Development* 124, 4505-4514.
- Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C. P., and Rao, M. S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 172, 383-397.
- Castonguay, A., and Robitaille, R. (2001). Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. *J Neurosci* 21, 1911-1922.
- Caughey, J. E., and Saucier, G. (1962). Endocrine aspects of dystrophia myotonica. *Brain* 85, 711-732.
- Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 102, 906-915.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275-280.
- Charlet, B. N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., and Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 10, 45-53.

- Chedotal, A. (2007). Slits and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 621, 65-80.
- Chen, L., and Daley, G. Q. (2008). Molecular basis of pluripotency. *Hum Mol Genet* 17, R23-27.
- Chen, Y., Aulia, S., Li, L., and Tang, B. L. (2006). AMIGO and friends: an emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. *Brain Res Rev* 51, 265-274.
- Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., *et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111-123.
- Cho, D. H., and Tapscott, S. J. (2007). Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim Biophys Acta* 1772, 195-204.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1977). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116, 227-247.
- Cobo, A., Martinez, J. M., Martorell, L., Baiget, M., and Johnson, K. (1993a). Molecular diagnosis of homozygous myotonic dystrophy in two asymptomatic sisters. *Hum Mol Genet* 2, 711-715.
- Cobo, A. M., Baiget, M., Lopez de Munain, A., Poza, J. J., Emparanza, J. I., and Johnson, K. (1993b). Sex-related difference in intergenerational expansion of myotonic dystrophy gene. *Lancet* 341, 1159-1160.
- Colman, A., and Dreesen, O. (2009). Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell Stem Cell* 5, 244-247.
- Colman, D. R. (1997). Neurites, synapses, and cadherins reconciled. *Mol Cell Neurosci* 10, 1-6.
- Cooper, T. A., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2009). RNA and disease. *Cell* 136, 777-793.
- Corcos, L., and Solier, S. (2005). [Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics]. *Med Sci (Paris)* 21, 253-260.
- Couteaux, R., and Pecot-Dechavassine, M. (1973). [Ultrastructural and cytochemical data on the mechanism of acetylcholine release in synaptic transmission]]. *Arch Ital Biol* 111, 231-262.
- Cox, W. G., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* 121, 4349-4358.
- D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K., and Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401.
- Damian, M. S., Gerlach, A., Schmidt, F., Lehmann, E., and Reichmann, H. (2001). Modafinil for excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy. *Neurology* 56, 794-796.
- Dansithong, W., Paul, S., Comai, L., and Reddy, S. (2005). MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem* 280, 5773-5780.
- Dansithong, W., Wolf, C. M., Sarkar, P., Paul, S., Chiang, A., Holt, I., Morris, G. E., Branco, D., Sherwood, M. C., Comai, L., *et al.* (2008). Cytoplasmic CUG RNA foci are insufficient to elicit key DM1 features. *PLoS One* 3, e3968.
- Dasen, J. S., and Jessell, T. M. (2009). Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Curr Top Dev Biol* 88, 169-200.

- Dasen, J. S., Liu, J. P., and Jessell, T. M. (2003). Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature* 425, 926-933.
- Davila, J. C., Cezar, G. G., Thiede, M., Strom, S., Miki, T., and Trosko, J. (2004). Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci* 79, 214-223.
- Davis, B. M., McCurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H., and Housman, D. E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7388-7393.
- Day, J. W., Ricker, K., Jacobsen, J. F., Rasmussen, L. J., Dick, K. A., Kress, W., Schneider, C., Koch, M. C., Beilman, G. J., Harrison, A. R., *et al.* (2003). Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology* 60, 657-664.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N. A., Ashizawa, T., Cooper, T. A., and Botas, J. (2006). MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 15, 2138-2145.
- de la Cruz, C. C., Der-Avakian, A., Spyropoulos, D. D., Tieu, D. D., and Carpenter, E. M. (1999). Targeted disruption of Hoxd9 and Hoxd10 alters locomotor behavior, vertebral identity, and peripheral nervous system development. *Dev Biol* 216, 595-610.
- de la Torre, J. R., Hopker, V. H., Ming, G. L., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M., Hemmati-Brivanlou, A., and Holt, C. E. (1997). Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* 19, 1211-1224.
- DeChiara, T. M., Bowen, D. C., Valenzuela, D. M., Simmons, M. V., Poueymirou, W. T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D. L., Rojas, E., Park, J. S., *et al.* (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85, 501-512.
- deLapeyriere, O., and Henderson, C. E. (1997). Motoneuron differentiation, survival and synaptogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 7, 642-650.
- Delaporte, C. (1998). Personality patterns in patients with myotonic dystrophy. *Arch Neurol* 55, 635-640.
- Dhaenens, C. M., Schraen-Maschke, S., Tran, H., Vingtdoux, V., Ghanem, D., Leroy, O., Delplanque, J., Vanbrussel, E., Delacourte, A., Vermersch, P., *et al.* (2008). Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp Neurol* 210, 467-478.
- Di Costanzo, A., de Cristofaro, M., Di Iorio, G., Daniele, A., Bonavita, S., and Tedeschi, G. (2009). Paternally inherited case of congenital DM1: brain MRI and review of literature. *Brain Dev* 31, 79-82.
- Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T., and Eggan, K. (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10, 608-614.
- Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., and Storey, K. (2003). Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40, 65-79.
- Diez del Corral, R., and Storey, K. G. (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* 26, 857-869.

- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221.
- Doniach, T. (1995). Basic FGF as an inducer of anteroposterior neural pattern. *Cell* 83, 1067-1070.
- Du, H., Cline, M. S., Osborne, R. J., Tuttle, D. L., Clark, T. A., Donohue, J. P., Hall, M. P., Shiue, L., Swanson, M. S., Thornton, C. A., and Ares, M., Jr. (2010). Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 17, 187-193.
- Durand, G. M., Bennett, M. V., and Zukin, R. S. (1993). Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6731-6735.
- Eberhart, J., Barr, J., O'Connell, S., Flagg, A., Swartz, M. E., Cramer, K. S., Tosney, K. W., Pasquale, E. B., and Krull, C. E. (2004). Ephrin-A5 exerts positive or inhibitory effects on distinct subsets of EphA4-positive motor neurons. *J Neurosci* 24, 1070-1078.
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Jr., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., and Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277-280.
- Ebraldize, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebraldize, K., and Junghans, R. P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 383-387.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., and Ben-Yosef, D. (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* 1, 568-577.
- Eiselleova, L., Peterkova, I., Neradil, J., Slaninova, I., Hampl, A., and Dvorak, P. (2008). Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol* 52, 353-363.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V., and Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* 22, 152-165.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87, 661-673.
- Fambrough, D. M. (1979). Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol Rev* 59, 165-227.
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J. D., and Hamshire, M. G. (2001). In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* 29, 2766-2771.
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshire, M. G., Harper, P. S., and Brook, J. D. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 11, 805-814.
- Faustino, N. A., and Cooper, T. A. (2005). Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Mol Cell Biol* 25, 879-887.

- Feng, G., Laskowski, M. B., Feldheim, D. A., Wang, H., Lewis, R., Frisen, J., Flanagan, J. G., and Sanes, J. R. (2000). Roles for ephrins in positionally selective synaptogenesis between motor neurons and muscle fibers. *Neuron* 25, 295-306.
- Flanagan, J. G., and Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21, 309-345.
- Foiry, L., Dong, L., Savouret, C., Hubert, L., te Riele, H., Junien, C., and Gourdon, G. (2006). Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice. *Hum Genet* 119, 520-526.
- Fu, Y. H., Friedman, D. L., Richards, S., Pearlman, J. A., Gibbs, R. A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M. B., Scarlato, G., Fenwick, R. G., Jr., and et al. (1993). Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260, 235-238.
- Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J. P., St Guily, J. L., Taneja, K., Gourdon, G., Junien, C., and Butler-Browne, G. S. (2001). Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 10, 2079-2087.
- Furukawa, N., Ongusaha, P., Jahng, W. J., Araki, K., Choi, C. S., Kim, H. J., Lee, Y. H., Kaibuchi, K., Kahn, B. B., Masuzaki, H., *et al.* (2005). Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. *Cell Metab* 2, 119-129.
- Ganesalingam, J., and Bowser, R. (2010). The application of biomarkers in clinical trials for motor neuron disease. *Biomark Med* 4, 281-297.
- Gantelet, E., Kraftsik, R., Delaloye, S., Gourdon, G., Kuntzer, T., and Barakat-Walter, I. (2007). The expansion of 300 CTG repeats in myotonic dystrophy transgenic mice does not induce sensory or motor neuropathy. *Acta Neuropathol* 114, 175-185.
- Gaspard, N., Bouschet, T., Herpoel, A., Naeije, G., van den Ameele, J., and Vanderhaeghen, P. (2009). Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 4, 1454-1463.
- Gaulden, J., and Reiter, J. F. (2008). Neur-ons and neur-offs: regulators of neural induction in vertebrate embryos and embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* 17, R60-66.
- Gautam, M., Noakes, P. G., Moscoso, L., Rupp, F., Scheller, R. H., Merlie, J. P., and Sanes, J. R. (1996). Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85, 525-535.
- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* 582, 1977-1986.
- Goetz, A. K., Scheffler, B., Chen, H. X., Wang, S., Suslov, O., Xiang, H., Brustle, O., Roper, S. N., and Steindler, D. A. (2006). Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11063-11068.
- Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., and Gourdon, G. (2007). CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet* 3, e52.
- Gourdon, G., Radvanyi, F., Lia, A. S., Duros, C., Blanche, M., Abitbol, M., Junien, C., and Hofmann-Radvanyi, H. (1997). Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice. *Nat Genet* 15, 190-192.

- Greenamyre, J. T., and Porter, R. H. (1994). Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* 44, S7-13.
- Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.
- Griggs, R. C., Jozefowicz, R., Kingston, W., Nair, K. S., Herr, B. E., and Halliday, D. (1990). Mechanism of muscle wasting in myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 27, 505-512.
- Group, T. H. s. D. C. R. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Huntington's Disease Collaborative Research Group *Cell* 72, 971-983.
- Gutman, C. R., Ajmera, M. K., and Hollyday, M. (1993). Organization of motor pools supplying axial muscles in the chicken. *Brain Res* 609, 129-136.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., *et al.* (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118, 3132-3142.
- Hammond, R., Vivancos, V., Naeem, A., Chilton, J., Mambetisaeva, E., Andrews, W., Sundaresan, V., and Guthrie, S. (2005). Slit-mediated repulsion is a key regulator of motor axon pathfinding in the hindbrain. *Development* 132, 4483-4495.
- Hamplova, B., Novakova, O., Tvrzicka, E., Kolar, F., and Novak, F. (2005). Protein kinase C activity and isoform expression during early postnatal development of rat myocardium. *Cell Biochem Biophys* 43, 105-117.
- Hao, M., Akrami, K., Wei, K., De Diego, C., Che, N., Ku, J. H., Tidball, J., Graves, M. C., Shieh, P. B., and Chen, F. (2008). Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Dev Dyn* 237, 403-410.
- Harland, R. (2000). Neural induction. *Curr Opin Genet Dev* 10, 357-362.
- Harmon, E. B., Harmon, M. L., Larsen, T. D., Paulson, A. F., and Perryman, M. B. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase is expressed in embryonic myocytes and is required for myotube formation. *Dev Dyn* 237, 2353-2366.
- Harper, P. S. (2001). *Myotonic dystrophy*. London: W.B. Saunders.
- Harper, P. S., Harley, H. G., Reardon, W., and Shaw, D. J. (1992). Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *Am J Hum Genet* 51, 10-16.
- Hatten, M. E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22, 511-539.
- Heins, N., Englund, M. C., Sjoblom, C., Dahl, U., Tønning, A., Bergh, C., Lindahl, A., Hanson, C., and Semb, H. (2004). Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 367-376.
- Henderson, C. E. (1996). Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* 6, 64-70.
- Hernandez-Hernandez, O., Bermudez-de-Leon, M., Gomez, P., Velazquez-Bernardino, P., Garcia-Sierra, F., and Cisneros, B. (2006). Myotonic dystrophy expanded CUG repeats disturb the expression and phosphorylation of tau in PC12 cells. *J Neurosci Res* 84, 841-851.
- Hickman-Davis, J. M., and Davis, I. C. (2006). Transgenic mice. *Paediatr Respir Rev* 7, 49-53.

- Hinman, M. N., and Lou, H. (2008). Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci* 65, 3168-3181.
- Ho, T. H., Bundman, D., Armstrong, D. L., and Cooper, T. A. (2005). Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 14, 1539-1547.
- Ho, T. H., Charlet, B. N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., and Cooper, T. A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *Embo J* 23, 3103-3112.
- Hoffman, L. M., and Carpenter, M. K. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 699-708.
- Holt, I., Jacquemin, V., Fardaei, M., Sewry, C. A., Butler-Browne, G. S., Furling, D., Brook, J. D., and Morris, G. E. (2009). Muscleblind-like proteins: similarities and differences in normal and myotonic dystrophy muscle. *Am J Pathol* 174, 216-227.
- Hong, S., Kang, U. J., Isacson, O., and Kim, K. S. (2008). Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. *J Neurochem* 104, 316-324.
- Horsley, V., Jansen, K. M., Mills, S. T., and Pavlath, G. K. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113, 483-494.
- Howeler, C. J., Busch, H. F., Geraedts, J. P., Niermeijer, M. F., and Staal, A. (1989). Anticipation in myotonic dystrophy: fact or fiction? *Brain* 112 (Pt 3), 779-797.
- Huang, C. F., Flucher, B. E., Schmidt, M. M., Stroud, S. K., and Schmidt, J. (1994). Depolarization-transcription signals in skeletal muscle use calcium flux through L channels, but bypass the sarcoplasmic reticulum. *Neuron* 13, 167-177.
- Iakova, P., Wang, G. L., Timchenko, L., Michalak, M., Pereira-Smith, O. M., Smith, J. R., and Timchenko, N. A. (2004). Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *Embo J* 23, 406-417.
- Itsykson, P., Ilouz, N., Turetsky, T., Goldstein, R. S., Pera, M. F., Fishbein, I., Segal, M., and Reubinoff, B. E. (2005). Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol Cell Neurosci* 30, 24-36.
- Jacquemin, V., Butler-Browne, G. S., Furling, D., and Mouly, V. (2007). IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes. *J Cell Sci* 120, 670-681.
- Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-582.
- Jalving, M., and Schepers, H. (2009). Induced pluripotent stem cells: will they be safe? *Curr Opin Mol Ther* 11, 383-393.
- Jansen, G., Groenen, P. J., Bachner, D., Jap, P. H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J. J., *et al.* (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 13, 316-324.
- Jassen, A. K., Yang, H., Miller, G. M., Calder, E., and Madras, B. K. (2006). Receptor regulation of gene expression of axon guidance molecules: implications for adaptation. *Mol Pharmacol* 70, 71-77.

- Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1, 20-29.
- Jessen, K. R., and Mirsky, R. (1999). Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 22, 402-410.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., and Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 13, 3079-3088.
- Jin, S., Shimizu, M., Balasubramanyam, A., and Epstein, H. F. (2000). Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) induces actin cytoskeletal reorganization and apoptotic-like blebbing in lens cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 45, 133-148.
- Johnson, J. M., Castle, J., Garrett-Engle, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R., and Shoemaker, D. D. (2003). Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 302, 2141-2144.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775.
- Kaliman, P., Catalucci, D., Lam, J. T., Kondo, R., Gutierrez, J. C., Reddy, S., Palacin, M., Zorzano, A., Chien, K. R., and Ruiz-Lozano, P. (2005). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 280, 8016-8021.
- Kaliman, P., and Llagostera, E. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cell Signal* 20, 1935-1941.
- Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A. J., Castle, J. C., Johnson, J. M., Burge, C. B., and Cooper, T. A. (2008). A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20333-20338.
- Kan, L., Israsena, N., Zhang, Z., Hu, M., Zhao, L. R., Jalali, A., Sahni, V., and Kessler, J. A. (2004). Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. *Dev Biol* 269, 580-594.
- Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., Timmers, A. M., Hauswirth, W. W., and Swanson, M. S. (2003). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978-1980.
- Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11748-11753.
- Kao, T. J., Palmesino, E., and Kania, A. (2009). SRC family kinases are required for limb trajectory selection by spinal motor axons. *J Neurosci* 29, 5690-5700.
- Karumbayaram, S., Kelly, T. K., Paucar, A. A., Roe, A. J., Umbach, J. A., Charles, A., Goldman, S. A., Kornblum, H. I., and Wiedau-Pazos, M. (2009). Human embryonic stem cell-derived motor neurons expressing SOD1 mutants exhibit typical signs of motor neuron degeneration linked to ALS. *Dis Model Mech* 2, 189-195.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I., and Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31-40.

- Kellerer, M., Lammers, R., Ermel, B., Tippmer, S., Vogt, B., Obermaier-Kusser, B., Ullrich, A., and Haring, H. U. (1992). Distinct alpha-subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities. *Biochemistry* 31, 4588-4596.
- Kennedy, T. E. (2000). Cellular mechanisms of netrin function: long-range and short-range actions. *Biochem Cell Biol* 78, 569-575.
- Kim, H. S., Oh, S. K., Park, Y. B., Ahn, H. J., Sung, K. C., Kang, M. J., Lee, L. A., Suh, C. S., Kim, S. H., Kim, D. W., and Moon, S. Y. (2005). Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 1228-1233.
- Kiskinis, E., and Eggan, K. (2010). Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 120, 51-59.
- Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E. C., Soriano, P., and Tapscott, S. J. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* 25, 105-109.
- Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D., and Tapscott, S. J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet* 16, 402-406.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481-485.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J., and Lanza, R. (2007). Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. *Nat Protoc* 2, 1963-1972.
- Krol, J., Fiszer, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., and Krzyzosiak, W. J. (2007). Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol Cell* 25, 575-586.
- Kumari, D., and Usdin, K. (2009). Chromatin remodeling in the noncoding repeat expansion diseases. *J Biol Chem* 284, 7413-7417.
- Kunze, D., and Olthoff, D. (1970). [Lipid content of human skeletal muscle in primary and secondary myopathies]. *Clin Chim Acta* 29, 455-462.
- Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270, 1628-1644.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., and Cooper, T. A. (2006). Misregulation of alternative splicing causes pathogenesis in myotonic dystrophy. *Prog Mol Subcell Biol* 44, 133-159.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G. S., and Cooper, T. A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* 28, 68-78.
- Ladd, A. N., Charlet, N., and Cooper, T. A. (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21, 1285-1296.
- Ladd, A. N., Stenberg, M. G., Swanson, M. S., and Cooper, T. A. (2005). Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development. *Dev Dyn* 233, 783-793.

- Landmesser, L. (1978). The distribution of motoneurons supplying chick hind limb muscles. *J Physiol* 284, 371-389.
- Laustriat (2010). Les cellules souches pluripotentes en modélisation pathologique pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques: application à la Dystrophie Myotonique de type 1. Thèse de biologie cellulaire et moléculaire.
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J. P., Duros, C., Savoy, D., Dehaupas, I., Luce, S., Johnson, K., and Junien, C. (1993). Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am J Hum Genet* 52, 875-883.
- Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., and Studer, L. (2007a). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25, 1468-1475.
- Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. A., Ganat, Y. M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., *et al.* (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402-406.
- Lee, H., Al Shamy, G., Elkabetz, Y., Schoefield, C. M., Harrision, N. L., Panagiotakos, G., Socci, N. D., Tabar, V., and Studer, L. (2007b). Directed Differentiation And Transplantation of Human Embryonic Stem Cell Derived Motoneurons. *Stem Cells*.
- Lee, J. E., and Cooper, T. A. (2009). Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem Soc Trans* 37, 1281-1286.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A. L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* 26, 1364-1366.
- Lehmann-Horn, F., and Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* 79, 1317-1372.
- Leroy, O., Dhaenens, C. M., Schraen-Maschke, S., Belarbi, K., Delacourte, A., Andreadis, A., Sablonniere, B., Buee, L., Sergeant, N., and Caillet-Boudin, M. L. (2006). ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. *J Neurosci Res* 84, 852-859.
- Lewis, B. P., Green, R. E., and Brenner, S. E. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 189-192.
- Li, Q., Lee, J. A., and Black, D. L. (2007). Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci* 8, 819-831.
- Li, X. J., Du, Z. W., Zarnowska, E. D., Pankratz, M., Hansen, L. O., Pearce, R. A., and Zhang, S. C. (2005). Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 215-221.
- Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 15, 2087-2097.
- Lindsay, M. A. (2003). Target discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2, 831-838.

- Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864-867.
- Liu, J. P., Laufer, E., and Jessell, T. M. (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* 32, 997-1012.
- Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T. P., Kondo, R., Reddy, S., Dillmann, W. H., Palacin, M., *et al.* (2007). Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS One* 2, e1134.
- Llamusi, B., and Artero, R. (2008). Molecular Effects of the CTG Repeats in Mutant Dystrophia Myotonica Protein Kinase Gene. *Curr Genomics* 9, 509-516.
- Logigian, E. L., Martens, W. B., Moxley, R. T. t., McDermott, M. P., Dilek, N., Wiegner, A. W., Pearson, A. T., Barbieri, C. A., Annis, C. L., Thornton, C. A., and Moxley, R. T., 3rd (2010). Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 74, 1441-1448.
- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., *et al.* (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38, 431-440.
- Lopez de Munain, A., Cobo, A. M., Huguet, E., Marti Masso, J. F., Johnson, K., and Baiget, M. (1994). CTG trinucleotide repeat variability in identical twins with myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 35, 374-375.
- Lou, X. Y., Nishi, Y., Haji, M., Antoku, Y., Tanaka, S., Ikuyama, S., Yanase, T., Takayanagi, R., and Nawata, H. (1994). Reserved Sertoli cell function in the hypogonadic male patients with myotonic dystrophy. *Fukuoka Igaku Zasshi* 85, 168-174.
- Lueck, J. D., Mankodi, A., Swanson, M. S., Thornton, C. A., and Dirksen, R. T. (2007). Muscle chloride channel dysfunction in two mouse models of myotonic dystrophy. *J Gen Physiol* 129, 79-94.
- Lukong, K. E., Chang, K. W., Khandjian, E. W., and Richard, S. (2008). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet* 24, 416-425.
- Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, 1109-1115.
- Lupo, G., Harris, W. A., and Lewis, K. E. (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7, 103-114.
- Lyssiotis, C. A., Foreman, R. K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L. L., Charette, B. D., Bouchez, L. C., *et al.* (2009). Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8912-8917.
- Ma, W., Tavakoli, T., Derby, E., Serebryakova, Y., Rao, M. S., and Mattson, M. P. (2008). Cell-Extracellular Matrix Interactions Regulate Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *BMC Dev Biol* 8, 90.
- Machuca-Tzili, L., Brook, D., and Hilton-Jones, D. (2005). Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32, 1-18.

- Maden, M. (1999). Heads or tails? Retinoic acid will decide. *Bioessays* 21, 809-812.
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., and et al. (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255.
- Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C. D., Bourne, T. D., and Phillips, L. H. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 38, 1066-1070.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., *et al.* (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55-70.
- Maitra, A., Arking, D. E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., Sui, G., Cutler, D. J., Liu, Y., Brimble, S. N., *et al.* (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37, 1099-1103.
- Mallon, B. S., Park, K. Y., Chen, K. G., Hamilton, R. S., and McKay, R. D. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1063-1075.
- Mankodi, A. (2008). Myotonic disorders. *Neurol India* 56, 298-304.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C. A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773.
- Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., Cannon, S. C., and Thornton, C. A. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 10, 35-44.
- Mankodi, A., Teng-Ummuay, P., Krym, M., Henderson, D., Swanson, M., and Thornton, C. A. (2003). Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol* 54, 760-768.
- Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* 10, 2165-2170.
- Marchetto, M. C., Muotri, A. R., Mu, Y., Smith, A. M., Cezar, G. G., and Gage, F. H. (2008). Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 649-657.
- Martin, J. J., Leroy, J. G., Ceuterick, C., Libert, J., Dodinval, P., and Martin, L. (1981). Fetal Krabbe leukodystrophy. A morphologic study of two cases. *Acta Neuropathol* 53, 87-91.
- Martini, R. (2001). The effect of myelinating Schwann cells on axons. *Muscle Nerve* 24, 456-466.
- Martorell, L., Illa, I., Rosell, J., Benitez, J., Sedano, M. J., and Baiget, M. (1996). Homozygous myotonic dystrophy: clinical and molecular studies of three unrelated cases. *J Med Genet* 33, 783-785.
- Martorell, L., Johnson, K., Boucher, C. A., and Baiget, M. (1997). Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)_n repeat during human fetal development. *Hum Mol Genet* 6, 877-880.

- Mastroyiannopoulos, N. P., Feldman, M. L., Uney, J. B., Mahadevan, M. S., and Phylactou, L. A. (2005). Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts. *EMBO Rep* 6, 458-463.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., *et al.* (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9, 625-635.
- Mateizel, I., De Becker, A., Van de Velde, H., De Rycke, M., Van Steirteghem, A., Cornelissen, R., Van der Elst, J., Liebaers, I., Van Riet, I., and Sermon, K. (2008). Efficient differentiation of human embryonic stem cells into a homogeneous population of osteoprogenitor-like cells. *Reprod Biomed Online* 16, 741-753.
- Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 21, 503-511.
- McClain, D. A. (1991). Different ligand affinities of the two human insulin receptor splice variants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol Endocrinol* 5, 734-739.
- McMahan, U. J., Horton, S. E., Werle, M. J., Honig, L. S., Kroger, S., Ruegg, M. A., and Escher, G. (1992). Agrin isoforms and their role in synaptogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 4, 869-874.
- McNeish, J. (2004). Embryonic stem cells in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 3, 70-80.
- Meola, G., Sansone, V., Perani, D., Scarone, S., Cappa, S., Dragoni, C., Cattaneo, E., Cotelli, M., Gobbo, C., Fazio, F., *et al.* (2003). Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2). *Neuromuscul Disord* 13, 813-821.
- Miescher, G. C., Taylor, V., Olivieri, G., Mindermann, T., Schrock, E., and Steck, A. J. (1997). Extensive splice variation and localization of the EHK-1 receptor tyrosine kinase in adult human brain and glial tumors. *Brain Res Mol Brain Res* 46, 17-24.
- Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B. E., Jaenisch, R., Lander, E. S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49-55.
- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* 19, 4439-4448.
- Mitake, S., Inagaki, T., Niimi, T., Shirai, T., and Yamamoto, M. (1989). [Development of Alzheimer neurofibrillary changes in two autopsy cases of myotonic dystrophy]. *Rinsho Shinkeigaku* 29, 488-492.
- Moller, D. E., Yokota, A., Caro, J. F., and Flier, J. S. (1989). Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* 3, 1263-1269.
- Monckton, D. G., Coolbaugh, M. I., Ashizawa, K. T., Siciliano, M. J., and Caskey, C. T. (1997). Hypermutable myotonic dystrophy CTG repeats in transgenic mice. *Nat Genet* 15, 193-196.
- Mooers, B. H., Logue, J. S., and Berglund, J. A. (2005). The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16626-16631.

- Moraes, K. C., Wilusz, C. J., and Wilusz, J. (2006). CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *Rna* 12, 1084-1091.
- Morizane, R., Monkawa, T., and Itoh, H. (2009). Differentiation of murine embryonic stem and induced pluripotent stem cells to renal lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 1334-1339.
- Morrison, S. J., Prowse, K. R., Ho, P., and Weissman, I. L. (1996). Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 5, 207-216.
- Mosthaf, L., Grako, K., Dull, T. J., Coussens, L., Ullrich, A., and McClain, D. A. (1990). Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *Embo J* 9, 2409-2413.
- Moxley, R. T., Corbett, A. J., Minaker, K. L., and Rowe, J. W. (1984). Whole body insulin resistance in myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 15, 157-162.
- Mukhopadhyay, D., Jung, J., Murmu, N., Houchen, C. W., Dieckgraefe, B. K., and Anant, S. (2003). CUGBP2 plays a critical role in apoptosis of breast cancer cells in response to genotoxic injury. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 504-509.
- Mulders, S. A., van Engelen, B. G., Wieringa, B., and Wansink, D. G. (2010). Molecular therapy in myotonic dystrophy: focus on RNA gain-of-function. *Hum Mol Genet* 19, R90-97.
- Mummery, C. L., Ward, D., and Passier, R. (2007). Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes by coculture with endoderm in serum-free medium. *Curr Protoc Stem Cell Biol Chapter 1*, Unit 1F 2.
- Murai, K. K., and Pasquale, E. B. (2004). Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *Neuroscientist* 10, 304-314.
- Nagao, M., Kato, S., Hayashi, H., and Misawa, H. (2003). Hyperproliferation of synapses on spinal motor neurons of Duchenne muscular dystrophy and myotonic dystrophy patients. *Acta Neuropathol* 106, 557-560.
- Nakagawa, S., Brennan, C., Johnson, K. G., Shewan, D., Harris, W. A., and Holt, C. E. (2000). Ephrin-B regulates the Ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. *Neuron* 25, 599-610.
- Napierala, M., and Krzyzosiak, W. J. (1997). CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins. *J Biol Chem* 272, 31079-31085.
- Nilsen, T. W., and Graveley, B. R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463, 457-463.
- Nishikawa, S., Goldstein, R. A., and Nierras, C. R. (2008). The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 725-729.
- Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J. R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. M., and Hong, K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 423, 990-995.
- Nordstrom, U., Jessell, T. M., and Edlund, T. (2002). Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat Neurosci* 5, 525-532.
- O'Leary, D. A., Vargas, L., Sharif, O., Garcia, M. E., Sigal, Y. J., Chow, S. K., Schmedt, C., Caldwell, J. S., Brinker, A., and Engels, I. H. (2010). HTS-Compatible Patient-Derived Cell-Based Assay to

- Identify Small Molecule Modulators of Aberrant Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1. *Curr Chem Genomics* 4, 9-18.
- Oh, S. K., Kim, H. S., Park, Y. B., Seol, H. W., Kim, Y. Y., Cho, M. S., Ku, S. Y., Choi, Y. M., Kim, D. W., and Moon, S. Y. (2005). Methods for expansion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 605-609.
- Orengo, J. P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D. R., Snipes, G. J., and Cooper, T. A. (2008). Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2646-2651.
- Orlikowski, D., Chevret, S., Quera-Salva, M. A., Laforet, P., Lofaso, F., Verschueren, A., Pouget, J., Eymard, B., and Annane, D. (2009). Modafinil for the treatment of hypersomnia associated with myotonic muscular dystrophy in adults: a multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, 4-week trial. *Clin Ther* 31, 1765-1773.
- Osborne, R. J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J. R., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 18, 1471-1481.
- Pachter, B. R., and Eberstein, A. (1986). Motor endplate involvement in the extraocular muscles of the myotonic rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224, 325-329.
- Paillard, L., Legagneux, V., and Beverley Osborne, H. (2003). A functional deadenylation assay identifies human CUG-BP as a deadenylation factor. *Biol Cell* 95, 107-113.
- Pal, R., Agbas, A., Bao, X., Hui, D., Leary, C., Hunt, J., Naniwadekar, A., Michaelis, M. L., Kumar, K. N., and Michaelis, E. K. (2003). Selective dendrite-targeting of mRNAs of NR1 splice variants without exon 5: identification of a cis-acting sequence and isolation of sequence-binding proteins. *Brain Res* 994, 1-18.
- Palmer, A., and Klein, R. (2003). Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev* 17, 1429-1450.
- Panaite, P. A., Gantelet, E., Kraftsik, R., Gourdon, G., Kuntzer, T., and Barakat-Walter, I. (2008). Myotonic dystrophy transgenic mice exhibit pathologic abnormalities in diaphragm neuromuscular junctions and phrenic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 763-772.
- Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.
- Park, J. D., and Radtke, R. A. (1995). Hypersomnolence in myotonic dystrophy: demonstration of sleep onset REM sleep. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58, 512-513.
- Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N. J., Comai, L., and Reddy, S. (2006). Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *Embo J* 25, 4271-4283.
- Pera, E. M., Ikeda, A., Eivers, E., and De Robertis, E. M. (2003). Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev* 17, 3023-3028.
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-12548.

- Personius, K. E., Nautiyal, J., and Reddy, S. (2005). Myotonia and muscle contractile properties in mice with SIX5 deficiency. *Muscle Nerve* 31, 503-505.
- Pevny, L. H., Sockanathan, S., Placzek, M., and Lovell-Badge, R. (1998). A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125, 1967-1978.
- Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T., and Jessell, T. M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84, 309-320.
- Philips, A. V., Timchenko, L. T., and Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T. M. (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97, 903-915.
- Pituello, F. (1997). Neuronal specification: generating diversity in the spinal cord. *Curr Biol* 7, R701-704.
- Placzek, M. (1995). The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Curr Opin Genet Dev* 5, 499-506.
- Plump, A. S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C. J., Goodman, C. S., Mason, C. A., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33, 219-232.
- Pooga, M., Land, T., Bartfai, T., and Langel, U. (2001). PNA oligomers as tools for specific modulation of gene expression. *Biomol Eng* 17, 183-192.
- Pouton, C. W., and Haynes, J. M. (2005). Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1918-1934.
- Prasad, A., and Hollyday, M. (1991). Development and migration of avian sympathetic preganglionic neurons. *J Comp Neurol* 307, 237-258.
- Ranum, L. P., and Cooper, T. A. (2006). RNA-Mediated Neuromuscular Disorders. *Annu Rev Neurosci*.
- Ranum, L. P., and Day, J. W. (2004). Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* 74, 793-804.
- Ranum, L. P., Rasmussen, P. F., Benzow, K. A., Koob, M. D., and Day, J. W. (1998). Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat Genet* 19, 196-198.
- Raper, J. A. (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 10, 88-94.
- Reddy, S., Smith, D. B., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., *et al.* (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 13, 325-335.
- Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1134-1140.
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12, 4565-4574.

- Ricker, K., Koch, M. C., Lehmann-Horn, F., Pongratz, D., Otto, M., Heine, R., and Moxley, R. T., 3rd (1994). Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts. *Neurology* 44, 1448-1452.
- Ridley, A. J. (2001). Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* 2, 303-310.
- Roberts, R., Timchenko, N. A., Miller, J. W., Reddy, S., Caskey, C. T., Swanson, M. S., and Timchenko, L. T. (1997). Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13221-13226.
- Robertson, E. J., Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1983). X-chromosome instability in pluripotential stem cell lines derived from parthenogenetic embryos. *J Embryol Exp Morphol* 74, 297-309.
- Robitaille, R. (1998). Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21, 847-855.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., and Jessell, T. M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445-455.
- Rosler, E. S., Fisk, G. J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M. S., and Carpenter, M. K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 229, 259-274.
- Salvatori, S., Fanin, M., Trevisan, C. P., Furlan, S., Reddy, S., Nagy, J. I., and Angelini, C. (2005). Decreased expression of DMPK: correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in myotonic dystrophy type 1. *Neurol Sci* 26, 235-242.
- Sams-Dodd, F. (2006a). Drug discovery: selecting the optimal approach. *Drug Discov Today* 11, 465-472.
- Sams-Dodd, F. (2006b). Strategies to optimize the validity of disease models in the drug discovery process. *Drug Discov Today* 11, 355-363.
- Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22, 389-442.
- Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2, 791-805.
- Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J. T., and Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 25, 110-114.
- Sarkar, P. S., Han, J., and Reddy, S. (2004). In situ hybridization analysis of Dmpk mRNA in adult mouse tissues. *Neuromuscul Disord* 14, 497-506.
- Savkur, R. S., Philips, A. V., and Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29, 40-47.
- Savouret, C., Brisson, E., Essers, J., Kanaar, R., Pastink, A., te Riele, H., Junien, C., and Gourdon, G. (2003). CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice. *Embo J* 22, 2264-2273.

- Savouret, C., Garcia-Cordier, C., Megret, J., te Riele, H., Junien, C., and Gourdon, G. (2004). MSH2-dependent germinal CTG repeat expansions are produced continuously in spermatogonia from DM1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 24, 629-637.
- Schara, U., and Schoser, B. G. (2006). Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. *Semin Pediatr Neurol* 13, 71-79.
- Schreiber, K. L., Paquet, L., Allen, B. G., and Rindt, H. (2001). Protein kinase C isoform expression and activity in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H2062-2071.
- Seino, S., and Bell, G. I. (1989). Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 312-316.
- Semb, H. (2005). Human embryonic stem cells: origin, properties and applications. *Apmis* 113, 743-750.
- Sergeant, N., Delacourte, A., and Buee, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 179-197.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. A., Wattez, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10, 2143-2155.
- Seznec, H., Lia-Baldini, A. S., Duros, C., Fouquet, C., Lacroix, C., Hofmann-Radvanyi, H., Junien, C., and Gourdon, G. (2000). Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet* 9, 1185-1194.
- Shamah, S. M., Lin, M. Z., Goldberg, J. L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R. L., Corfas, G., Debant, A., and Greenberg, M. E. (2001). EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105, 233-244.
- Sharma, K., Sheng, H. Z., Lettieri, K., Li, H., Karavanov, A., Potter, S., Westphal, H., and Pfaff, S. L. (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell* 95, 817-828.
- Shi, Y., Do, J. T., Desponts, C., Hahm, H. S., Scholer, H. R., and Ding, S. (2008). A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 525-528.
- Shirasaki, R., and Pfaff, S. L. (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci* 25, 251-281.
- Simeone, L., Straubinger, M., Khan, M. A., Nalleweg, N., Cheusova, T., and Hashemolhosseini, S. (2010). Identification of Erbin interlinking MuSK and ErbB2 and its impact on acetylcholine receptor aggregation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 30, 6620-6634.
- Snaith, M. R., and Tornell, J. (2002). The use of transgenic systems in pharmaceutical research. *Brief Funct Genomic Proteomic* 1, 119-130.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G. W., Cook, E. G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., *et al.* (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136, 964-977.
- Sonntag, K. C., Pruszak, J., Yoshizaki, T., van Arensbergen, J., Sanchez-Pernaute, R., and Isacson, O. (2007). Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from

- human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin. *Stem Cells* 25, 411-418.
- Squillace, R. M., Chenault, D. M., and Wang, E. H. (2002). Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR. *Dev Biol* 250, 218-230.
- Stern, C. D. (2001). Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat Rev Neurosci* 2, 92-98.
- Stewart, R., Stojkovic, M., and Lako, M. (2006). Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer* 42, 1257-1272.
- Storey, K. G., Goriely, A., Sargent, C. M., Brown, J. M., Burns, H. D., Abud, H. M., and Heath, J. K. (1998). Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. *Development* 125, 473-484.
- Stranock, S. D., and Davis, J. N. (1978). Ultrastructure of the muscle spindle in dystrophia myotonica. II. The sensory and motor nerve terminals. *Neuropathol Appl Neurobiol* 4, 407-418.
- Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2008). Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development* 135, 2969-2979.
- Tabar, V., Panagiotakos, G., Greenberg, E. D., Chan, B. K., Sadelain, M., Gutin, P. H., and Studer, L. (2005). Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nat Biotechnol* 23, 601-606.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2, 3081-3089.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tanabe, Y., William, C., and Jessell, T. M. (1998). Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* 95, 67-80.
- Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., and Singer, R. H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* 128, 995-1002.
- Tapscott, S. J. (2000). Deconstructing myotonic dystrophy. *Science* 289, 1701-1702.
- Tarnopolsky, M., Mahoney, D., Thompson, T., Naylor, H., and Doherty, T. J. (2004). Creatine monohydrate supplementation does not increase muscle strength, lean body mass, or muscle phosphocreatine in patients with myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve* 29, 51-58.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., and Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7844-7848.
- Thornell, L. E., Lindstom, M., Renault, V., Klein, A., Mouly, V., Ansved, T., Butler-Browne, G., and Furling, D. (2009). Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35, 603-613.

- Thornton, C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C., and Moxley, R. T., 3rd (1997). Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet* 16, 407-409.
- Timchenko, L. T., Miller, J. W., Timchenko, N. A., DeVore, D. R., Datar, K. V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C. T., and Swanson, M. S. (1996). Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 24, 4407-4414.
- Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., and Timchenko, L. T. (2001a). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 276, 7820-7826.
- Timchenko, N. A., Iakova, P., Cai, Z. J., Smith, J. R., and Timchenko, L. T. (2001b). Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol* 21, 6927-6938.
- Timchenko, N. A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z. J., Quan, L., and Timchenko, L. T. (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 279, 13129-13139.
- Timchenko, N. A., Welm, A. L., Lu, X., and Timchenko, L. T. (1999). CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPβ mRNA and regulates translation of C/EBPβ isoforms. *Nucleic Acids Res* 27, 4517-4525.
- Tiret, L., Le Mouellic, H., Maury, M., and Brulet, P. (1998). Increased apoptosis of motoneurons and altered somatotopic maps in the brachial spinal cord of Hoxc-8-deficient mice. *Development* 125, 279-291.
- Tokumoto, Y., Ogawa, S., Nagamune, T., and Miyake, J. (2010). Comparison of efficiency of terminal differentiation of oligodendrocytes from induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells in vitro. *J Biosci Bioeng* 109, 622-628.
- Tome, S., Holt, I., Edelmann, W., Morris, G. E., Munnich, A., Pearson, C. E., and Gourdon, G. (2009). MSH2 ATPase domain mutation affects CTG**CAG* repeat instability in transgenic mice. *PLoS Genet* 5, e1000482.
- Traynelis, S. F., Hartley, M., and Heinemann, S. F. (1995). Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268, 873-876.
- Trip, J., Drost, G., van Engelen, B. G., and Faber, C. G. (2006). Drug treatment for myotonia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004762.
- Tunnacliffe, A., Liu, L., Moore, J. K., Leversha, M. A., Jackson, M. S., Papi, L., Ferguson-Smith, M. A., Thiesen, H. J., and Ponder, B. A. (1993). Duplicated KOX zinc finger gene clusters flank the centromere of human chromosome 10: evidence for a pericentric inversion during primate evolution. *Nucleic Acids Res* 21, 1409-1417.
- Turnpenny, P., Clark, C., and Kelly, K. (1994). Intelligence quotient profile in myotonic dystrophy, intergenerational deficit, and correlation with CTG amplification. *J Med Genet* 31, 300-305.
- Urrutia, R. (2003). KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol* 4, 231.
- Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 118, 4495-4509.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F. P., and et al. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG

- repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65, 905-914.
- Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukhareno, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., and Kuliev, A. (2005). Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online* 10, 105-110.
- Vihola, A., Bassez, G., Meola, G., Zhang, S., Haapasalo, H., Paetau, A., Mancinelli, E., Rouche, A., Hogrel, J. Y., Laforet, P., *et al.* (2003). Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2. *Neurology* 60, 1854-1857.
- Vlachopapadopoulou, E., Zachwieja, J. J., Gertner, J. M., Manzione, D., Bier, D. M., Matthews, D. E., and Slonim, A. E. (1995). Metabolic and clinical response to recombinant human insulin-like growth factor I in myotonic dystrophy--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3715-3723.
- Vlasova, I. A., and Bohjanen, P. R. (2008). Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biol* 5, 201-207.
- Vlasova, I. A., Tahoe, N. M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J. R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C. S., Bitterman, P. B., and Bohjanen, P. R. (2008). Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell* 29, 263-270.
- Vogt, B., Carrascosa, J. M., Ermel, B., Ullrich, A., and Haring, H. U. (1991). The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 177, 1013-1018.
- von Giesen, H. J., Stoll, G., Koch, M. C., and Beneck, R. (1994). Mixed axonal-demyelinating polyneuropathy as predominant manifestation of myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* 17, 701-703.
- Wagner, K. R., Fleckenstein, J. L., Amato, A. A., Barohn, R. J., Bushby, K., Escolar, D. M., Flanigan, K. M., Pestronk, A., Tawil, R., Wolfe, G. I., *et al.* (2008). A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol* 63, 561-571.
- Wakamatsu, H., Nakamura, H., Ito, K., Anazawa, W., Okajima, S., Shigeno, K., and Goto, Y. (1972). Concentration and fatty acid composition of serum lipids in myotonia dystrophica. With special reference to pathogenesis. *Horm Metab Res* 4, 458-462.
- Wang, G. S., Kearney, D. L., De Biasi, M., Taffet, G., and Cooper, T. A. (2007). Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 2802-2811.
- Wang, G. S., Kuyumcu-Martinez, M. N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X. H., and Cooper, T. A. (2009). PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J Clin Invest* 119, 3797-3806.
- Wang, P., and Bitar, K. N. (1998). Rho A regulates sustained smooth muscle contraction through cytoskeletal reorganization of HSP27. *Am J Physiol* 275, G1454-1462.
- Wansink, D. G., van Herpen, R. E., Coerwinkel-Driessen, M. M., Groenen, P. J., Hemmings, B. A., and Wieringa, B. (2003). Alternative splicing controls myotonic dystrophy protein kinase structure, enzymatic activity, and subcellular localization. *Mol Cell Biol* 23, 5489-5501.
- Wansink, D. G., and Wieringa, B. (2003). Transgenic mouse models for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Cytogenet Genome Res* 100, 230-242.

- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.
- Westerlaken, J. H., Van der Zee, C. E., Peters, W., and Wieringa, B. (2003). The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas. *Brain Res* 971, 116-127.
- Wheeler, T. M. (2008). Myotonic dystrophy: therapeutic strategies for the future. *Neurotherapeutics* 5, 592-600.
- Wheeler, T. M., Krym, M. C., and Thornton, C. A. (2007a). Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 17, 242-247.
- Wheeler, T. M., Lueck, J. D., Swanson, M. S., Dirksen, R. T., and Thornton, C. A. (2007b). Correction of CLC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 3952-3957.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110, 385-397.
- Williams, D. R. (2006). Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Intern Med J* 36, 652-660.
- Wilson, S. I., and Edlund, T. (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* 4 Suppl, 1161-1168.
- Witzemann, V. (2006). Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res* 326, 263-271.
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- Wong, K., Park, H. T., Wu, J. Y., and Rao, Y. (2002). Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Curr Opin Genet Dev* 12, 583-591.
- Wright, W. E., Sassoon, D. A., and Lin, V. K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56, 607-617.
- Yadava, R. S., Frenzel-McCardell, C. D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A. L., Puymirat, J., Thornton, C. A., Prall, O. W., Harvey, R. P., and Mahadevan, M. S. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet* 40, 61-68.
- Yotova, V., Labuda, D., Zietkiewicz, E., Gehl, D., Lovell, A., Lefebvre, J. F., Bourgeois, S., Lemieux-Blanchard, E., Labuda, M., Vezina, H., *et al.* (2005). Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum Genet* 117, 177-187.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J. A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797-801.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Zambrowicz, B. P., and Sands, A. T. (2003). Knockouts model the 100 best-selling drugs--will they model the next 100? *Nat Rev Drug Discov* 2, 38-51.

- Zeesman, S., Carson, N., and Whelan, D. T. (2002). Paternal transmission of the congenital form of myotonic dystrophy type 1: a new case and review of the literature. *Am J Med Genet* 107, 222-226.
- Zhang, L., Lee, J. E., Wilusz, J., and Wilusz, C. J. (2008). The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy. *J Biol Chem* 283, 22457-22463.
- Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., and Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1129-1133.
- Zhang, W., Liu, H., Han, K., and Grabowski, P. J. (2002). Region-specific alternative splicing in the nervous system: implications for regulation by the RNA-binding protein NAPOR. *Rna* 8, 671-685.
- Zheng, J. Q. (2000). Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions. *Nature* 403, 89-93.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381-384.
- Zhou, J. M., Chu, J. X., and Chen, X. J. (2008). An improved protocol that induces human embryonic stem cells to differentiate into neural cells in vitro. *Cell Biol Int* 32, 80-85.
- Zou, J., Maeder, M. L., Mali, P., Pruetz-Miller, S. M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B. K., Chen, G., Ye, Z., Park, I. H., Daley, G. Q., *et al.* (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 97-110.